

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**



FACOLTÀ DI FARMACIA

**Tesi di Dottorato di Ricerca
in
Scienza del Farmaco
*XVIII CICLO 2002-2005***

**Estrazione, caratterizzazione ed attività
biologica di metaboliti da piante
appartenenti alla famiglia delle Lamiaceae**

**Tutor
Ch.mo Prof.
Felice Senatore**

**Coordinatore
Ch.mo Prof.
Enrico Abignente**

**Candidato
Dott. Armando Grassia**

INDICE

RINGRAZIAMENTI	pag 5
ABSTRACT	pag 6
INTRODUZIONE	pag 8
CAPITOLO I . Lamiaceae e proprietà biologiche dei composti isolati	pag 14
1.1 Lamiaceae	pag 14
1.1.1 <i>Famiglia</i>	pag 14
1.1.2 <i>Sistematica delle Lamiaceae</i>	pag 15
1.1.3 <i>Distribuzione geografica, habitat ed interesse</i>	pag 17
1.2 Proprietà biologiche dei composti isolati	pag 18
1.2.1 <i>Terpeni e Diterpeni</i>	pag 19
1.2.2 <i>Fenilpropanoidi</i>	pag 23
1.2.3 <i>Flavonoidi</i>	pag 26
1.2.4 <i>Oli Essenziali</i>	pag 31
CAPITOLO II. Il Genere <i>Marrubium</i>	pag 35
2.1 Botanica ed usi	pag 35
2.1.1 <i>Descrizione</i>	pag 35
2.1.2 <i>Generalità</i>	pag 35
2.1.3 <i>Distribuzione geografica</i>	pag 37
2.1.4 <i>Proprietà farmacologiche ed impiego terapeutico</i>	pag 38
2.2 Estrazione ed isolamento di diterpeni labdanici da <i>Marrubium globosum</i> ssp. <i>libanoticum</i>	pag 39
2.2.1 <i>Caratteristiche del campione</i>	pag 39
2.2.2 <i>Estrazione ed isolamento</i>	pag 39
2.2.3 <i>Caratterizzazione dei composti</i>	pag 45
2.2.3a Composto 1	pag 45
2.2.3b Composto 2	pag 47
2.2.3c Cyllenina A (3) e 15-<i>epi</i>-cyllenina A (4)	pag 49
2.2.3d Composti 5 e 6	pag 52
2.2.3d _a 15-Metossi-cyllenina A (5)	pag 52
2.2.3d _b 15-Metossi-15-<i>epi</i>-cyllenina A (6)	pag 52
2.2.3d _c Composto 2	pag 53
2.2.3e Composto 7 (6-deacetyl vitexilattone)	pag 55
2.2.3f Composto 8 (marrulibanoside)	pag 57
2.2.3g Composto 9 (acido marrulanico)	pag 59
2.2.4 <i>Materiali e metodi</i>	pag 61
2.3 Attività antiinfiammatoria dell'estratto acetonic	pag 61
2.3.1 <i>Materiali e metodi</i>	pag 62
2.3.1a Animali	pag 62
2.3.1b Edema da carragenina	pag 62
2.3.1c Dosaggio radioimmunologico della prostaglandine	pag 63

2.3.1d Valutazione dell'espressione della COX-2 e della iNOS mediante analisi Western Blot	pag 64
2.3.1e Analisi statistica	pag 65
2.3.2 Risultati	pag 65
2.3.2a Valutazione dell'espressione della COX-2 e della iNOS mediante analisi Western Blot	pag 65
2.4 Estrazione ed isolamento di flavonoidi e fenilpropanoidi dalle parti aeree di <i>Marrubium globosum</i> ssp. <i>libanoticum</i>	pag 68
2.4.1 Caratteristiche del campione	pag 68
2.4.2 Estrazione ed isolamento	pag 68
2.4.3 Risultati	pag 69
2.4.3a Flavonoidi	pag 71
2.4.3b Fenilpropanoidi	pag 80
2.4.4 Materiale e metodi	pag 85
2.5 Isolamento e caratterizzazione dell'olio essenziale di <i>M. globosum</i> ssp. <i>libanoticum</i> e <i>M. cuneatum</i>	pag 86
2.5.1 Caratteristiche dei campioni	pag 86
2.5.2 Isolamento degli oli	pag 86
2.5.3 Analisi degli oli	pag 86
2.5.4 Valutazione dell'attività antimicrobica	pag 88
2.5.5 Risultati	pag 89
CAPITOLO III. Altre Lamiaceae studiate	pag 95
3.1 Altre Lamiaceae	pag 95
3.1.1 <i>Mentha piperita</i>	pag 95
3.1.1a Descrizione e generalità	pag 95
3.1.1b Proprietà	pag 95
3.1.2 <i>Ocimum basilicum</i>	pag 97
3.1.2a Descrizione e generalità	pag 97
3.1.2b Proprietà	pag 97
3.1.3 <i>Rosmarinus officinalis</i>	pag 99
3.1.3a Descrizione e generalità	pag 99
3.1.3b Proprietà	pag 99
3.1.4 <i>Salvia officinalis</i>	pag 101
3.1.4a Descrizione e generalità	pag 101
3.1.4b Proprietà	pag 101
3.1.5 <i>Thymus pulegioides</i>	pag 103
3.1.5a Descrizione e generalità	pag 103
3.1.5b Proprietà	pag 103
3.2 Materiale e Metodi	pag 105
3.2.1 Caratteristiche dei campioni	pag 105
3.2.2 Isolamento dell'olio essenziale	pag 105
3.2.3 Analisi degli oli	pag 105
3.2.4 Attività antibatterica	pag 105
3.3 Risultati	pag 107
3.3.1 Composizione degli oli essenziali	pag 107
3.3.2 Attività antibatterica	pag 107

CONCLUSIONI

pag 112

BIBLIOGRAFIA

pag 115

RINGRAZIAMENTI

In questi ultimi giorni di intenso lavoro spesso i miei pensieri sono andati alle innumerevoli “imprese” di questi ultimi anni che certamente ricorderò per sempre.

Vorrei ringraziare tutte le persone che hanno contribuito a rendere produttivi e piacevoli questi tre anni di dottorato e la stesura di questa tesi. Primo fra tutti il mio Tutor, il Prof. Felice Senatore per la generosità con cui, tra mille impegni, ha sempre trovato tempo per me.

Vorrei ringraziare i miei colleghi ed in particolare la dott. Daniela Rigano per la sua disponibilità e flessibilità nell'aiutarmi a progettare l'iter del mio dottorato. La stesura di questa tesi è stata arricchita dalle nostre discussioni significative ed istruttive.

Inoltre vorrei ringraziare tutti i compagni di laboratorio, passati e presenti, con i quali ho condiviso la mia vita lavorativa. Il loro aiuto ed il loro sostegno sono stati impagabili.

La mia più profonda gratitudine va al Prof. Maurizio Bruno per la sua immensa disponibilità e le sue parole di sostegno e di stima.

Grazie al Prof. Enrico Abignente, coordinatore preciso e attento di questa Scuola di Dottorato.

Un GRAZIE INFINITO ai miei genitori, a mio fratello, a mia zia Walnea, e alla mia dolce Loreta per l'affetto, il sostegno e la comprensione, ancora una volta, senza il loro amore e la loro pazienza questo lavoro non sarebbe stato possibile. Dedico questa tesi a loro.

ABSTRACT

La mia tesi di dottorato riguarda lo studio fitochimico e l'analisi dell'attività biologica di alcune piante appartenenti alla famiglia delle Lamiaceae. Le Lamiaceae sono rappresentate da circa 3200 specie, diffuse in tutte le parti del mondo, ma particolarmente nella regione mediterranea che rappresenta il principale centro di differenziazione della famiglia.

Il primo campione preso in esame e studiato in modo più approfondito era costituito dalle parti aeree di *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum* proveniente dal Libano. I suoi componenti che si presentavano in miscele complesse di natura chimica assai diversificata hanno richiesto differenti metodiche estrattive.

Dall'estratto acetoneico sono stati isolati e caratterizzati cinque nuovi diterpeni naturali appartenenti alla classe dei labdani ed altri due composti già noti. In alcuni casi, poiché tali molecole si presentavano in miscela, è stato necessario operare delle trasformazioni chimiche per separarle e procedere all'indagine strutturale. L'estratto acetoneico è stato testato in un modello di infiammazione *in vivo*, l'edema da carragenina nella zampa di ratto, dimostrando buona attività antiinfiammatoria. Tale attività è stata correlata all'inibizione dell'espressione di iNOS e COX-2 e sembra principalmente dovuta al composto maggioritario, il marrulibanoside, isolato dalla frazione più attiva dell'estratto.

Dall'estratto metanolico è stata isolata e caratterizzata, per la prima volta nel genere *Marrubium*, la naringenina 7-O- β -D-glucoside, un flavonone, ed altre dieci molecole mai isolate precedentemente in questa specie. Contrariamente alle specie finora studiate, in cui prevalgono i flavoni rispetto ai flavonoli, questo lavoro ha mostrato una completa dominanza in *Marrubium globosum* di flavonoli. Questi flavonoidi sono presenti

esclusivamente in forma glicosilata, e ciò rappresenta un'ulteriore caratteristica che contraddistingue questa specie.

Infine una piccola porzione di matrice vegetale è stata sottoposta ad un processo di idrodistillazione per ottenere l'olio essenziale di *M. globosum* ssp. *libanoticum*, di cui è stata studiata la composizione chimica e l'attività antibatterica su batteri sia di tipo Gram – sia Gram +. Tali dati, confrontati con quelli relativi ad un'altra specie il *Marrubium cuneatum*, hanno rivelato che l'olio essenziale del primo è più attivo su tutti i ceppi batterici testati. Dalle altre Lamiaceae: *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*, *Thymus pulegioides* è stato estratto ed analizzato l'olio essenziale di cui è stata anche saggiata l'attività antibatterica, che si è rilevata elevata soprattutto per quanto riguarda Timo e Rosmarino.

INTRODUZIONE

La Terra, per una serie di fortunate coincidenze, è ancora oggi un luogo pieno di Vita e le sue molteplici espressioni sono funzione di innumerevoli variabili; certamente la maggioranza degli esseri viventi appartiene al Regno Vegetale e l'uomo, che da sempre ha interagito con l'ambiente che lo circonda, ha tratto enormi vantaggi dall'utilizzo dei derivati vegetali.

A testimonianza di ciò esistono tracce come i disegni rupestri o documenti antichissimi da cui si evince in modo inequivocabile il ruolo di primaria importanza che giocavano le piante nelle principali culture del passato.

I più antichi documenti scritti, relativi all'uso e alle proprietà dei medicinali e dei veleni, appartengono alla civiltà cinese: famoso è l'Erbario di Shen Nung risalente al 2700 a.C. il *Pen Ts'ao Ching* (Il classico delle erbe, noto anche come *Shen Nung Materia Medica*) che riporta la descrizione di numerose piante officinali e perfino 237 prescrizioni erboristiche basate su dozzine di erbe tra cui l'efedra (*Ephedra sp.*), il rabarbaro (*Rheum sp.*) ed il papavero da oppio (*Papaver somniferum*).

Anche in India, come in Cina, l'uso delle piante officinali è antichissimo. Il termine tradizionale per indicare la medicina indiana è *ayurveda*, che deriva dal sanscrito *ayur* (vita) e *veda* (conoscenza). Essa discende dai Veda, i quattro libri indiani della saggezza; il più antico, il Rig Veda, risale a 3000-4500 anni fa e oltre a inni votivi, descrive operazioni chirurgiche e formule per medicinali composti da 67 erbe, tra cui lo zenzero (*Zingiber officinale*), la cannella (*Cinnamomum sp.*), la senna (*Cassia itoter* e altre specie indicate talvolta con il sinonimo *Senna sp.*) e la *Rauwolfia serpentina*, da cui si ricava la itoterap a potente azione ipotensiva.

I documenti che permettono di risalire alle origini della cultura medica occidentale sono le tavolette sumeriche di Nipur del 3000 a.C. che riportano i nomi di droghe vegetali. Il famoso papiro, databile 1600 a.C., ritrovato da Ebers a Luxor, nei suoi quasi 20 metri di lunghezza riporta l'esperienza di più di un millennio di medicina egizia, elencando 876 formule erboristiche basate su più di 500 piante, di cui quasi un terzo compare ancora nelle farmacopee occidentali.

Se la prima classificazione organica di circa 300 specie di piante medicinali risale a Ippocrate di Coa (460-377 a.C.), il più celebre tra i grandi medici greci, il più antico trattato sistematico di Botanica Farmaceutica, *De Historia Plantarum*, fu scritto da Teofrasto (372-287 a.C.). Alcuni secoli più tardi, l'opera di Ippocrate fu ampliata da Dioscoride Pedanio (Anazarba, Cilicia, I secolo d.C.) che inventariò più di 500 droghe di origine minerale, vegetale e animale in un celebre trattato scritto in greco nel 77 d.C., poi tradotto in latino nel XV secolo con il titolo di *De Materia Medica*.

L'epoca romana vede comparire i primi trattati di farmacognosia e farmacoterapia, in cui i farmaci non vengono riportati sotto forma di semplici elenchi, ma secondo criteri sistematici e descrittivi che si riferiscono all'uso, agli effetti utili o dannosi ed alle modalità di somministrazione. Tra le più significative opere di quest'epoca, oltre il già citato *De Materia Medica* è il *De artibus* di Celso Aulo Cornelio (I secolo d.C.), che trattano tutta la conoscenza medica dell'epoca, inclusa quella relativa alle proprietà medicamentose delle piante. Va ancora ricordato Plinio il Vecchio la cui opera, *Historia Naturalis*, è ancora oggi fondamentale, come fondamentale è l'opera di Galeno. In quest'epoca, inoltre, è bene ricordare che si cercava soprattutto il rimedio universale, miscelando un gran numero di droghe; sotto Nerone, per esempio, la famosa *Teriaca* ne richiedeva almeno un centinaio.

Durante il periodo dell'oscurantismo che fece seguito allo smembramento dell'Impero Romano, le opere di questi studiosi rimangono l'unica base della medicina, che si perfezionerà lentamente attraverso il Medioevo grazie all'apporto di ricercatori arabi (Avicenna e Serapione nel X e XI secolo) e della Scuola di Salerno (XIV e XV secolo), ai quali si devono molti elenchi di piante, trattati di medicina e raccolte di formule.

E' nel XVIII secolo che avviene la svolta radicale della botanica: lo svedese Carl von Linné (Linneo, 1707-1778), tenendo conto del numero degli stami nei fiori e dei pistilli e della loro organizzazione, sviluppa una suddivisione in classi, ordini, generi e specie del mondo vegetale che, adottando la nomenclatura binomia, permette di identificare ogni organismo vivente.

Alla fine del XVIII secolo, le droghe sono ancora usate sotto forma di polveri, estratti semplici o tinte. Comunque, nel 1803 Serturmer isola la morfina dall'oppio, e questa scoperta introduce una nuova era nella storia della medicina, caratterizzata dall'isolamento ed identificazione chimica dei composti farmacologicamente attivi a partire dalle droghe. La scoperta della morfina è presto seguita dall'isolamento di molti altri composti importanti come la stricnina (1817), chinina e caffeina (1820), nicotina (1828) atropina (1832), cocaina (1855), e la miscela di glicosidi cardioattivi, digitalina, dalle foglie di *Digitalis purpurea* nel 1868.

Nel XIX secolo, con lo sviluppo della chimica organica, vengono determinate le strutture chimiche di molti dei composti isolati. Questo sviluppo è proseguito con una velocità sempre crescente nel XX secolo. Dal 1950, l'interesse si è focalizzato sulle reazioni mediante le quali le piante producono questi componenti; un grande successo della ricerca in questo campo è stata l'estrazione e la caratterizzazione del tassolo per il

cui utilizzo in terapia ha giocato un ruolo fondamentale la comprensione dei meccanismi biosintetici.

Oggetto della presente tesi è l'isolamento e la caratterizzazione chimica dei componenti ad attività biologica da piante appartenenti alla famiglia delle Lamiaceae attraverso lo studio dei metaboliti secondari: tali molecole, malgrado siano presenti in piccole concentrazioni, sono importantissime in quanto contribuiscono al mantenimento di un equilibrio biologico armonioso del corpo ed aiutano l'organismo a difendersi da patologie diffuse, come il cancro, o malattie a carico del sistema cardiovascolare. Queste funzioni derivano dalla proprietà di talune molecole di svolgere attività terapeutica, interagire con altri nutrienti, sostanze tossiche e farmaci, modificandone attività e durata d'azione. I metaboliti secondari presentano una vasta gamma di proprietà chimiche, fisiche e biochimiche. Spesso sono molecole complesse che possono essere scisse con usuali reazioni chimiche o biochimiche in più parti con differenti strutture, ad attività biologiche sensibilmente diverse dal metabolita originale.

Lo studio è stato condotto con metodiche tradizionali quando possibile, ma più spesso utilizzando metodiche recenti per l'isolamento, la purificazione ed in particolare la caratterizzazione di particolari sostanze.

Il problema dell'isolamento e della purificazione dei metaboliti secondari è stato risolto con l'impiego di tecniche cromatografiche (TLC, gel filtrazione, HPLC preparativa in fase diretta ed in fase inversa). La caratterizzazione strutturale è stata effettuata mediante indagini spettroscopiche preliminari (UV, ESI-MS), seguite dall'analisi degli spettri NMR monodimensionali (^1H e ^{13}C), di correlazione bidimensionale omonucleare (COSY) ed eteronucleare (HSQC). A volte si è fatto ricorso a tecniche NMR più raffinate come l'effetto Overhauser (NOESY). In alcuni

casi, è stato necessario operare delle trasformazioni chimiche sulle molecole isolate, per procedere all'indagine strutturale.

Si è effettuata anche l'estrazione dell'olio essenziale, attenendoci a quanto prescritto dalla terza edizione della Farmacopea Europea e l'analisi dei campioni è stata condotta mediante GC e GC-MS utilizzando una serie di standard.

Inoltre, in base a dati presenti in letteratura, sono stati fatti studi per valutare l'attività antinfiammatoria degli estratti e dei metaboliti e l'attività antibatterica degli oli essenziali.

Tra le piante oggetto di questa tesi il *Marrubium globosum* Montbr. et Auch. ex Benth. ssp. *libanoticum* (Boiss) Davis ed il *Marrubium cuneatum* Banks et Solander sono stati studiati perché costituivano delle specie poco diffuse del genere e perché si intendeva confrontare la loro composizione chimica con quella ottenuta negli studi precedenti. Il sito di raccolta è particolare per cui è stato necessario ottenere specifiche autorizzazioni concesse alla Prof.ssa Nelly Apostolides Arnold della Facoltà di Scienze Agrarie dell'Università di Saint Esprit, Kaslik (Beirut, Libano) dalle autorità governative libanesi.

Le altre piante sono state studiate perché tipiche della flora della Regione Campania e molto impiegate oltre che in campo alimentare anche nella medicina popolare (tab. 1).

Tab.1: Lamiaceae studiate

Pianta	Provenienza	Materiale botanico	Composti studiati
<i>Marrubium globosum</i>	Col de Cèdres (Libano)	Parti aeree	Diterpeni Flavonoidi Fenilpropanoidi Olio essenziale
<i>Marrubium cuneatum</i>	Rachaya Al Uadi (Libano)	Parti aeree	Olio essenziale
<i>Mentha piperita</i>	Monti Lattari (NA)	Parti aeree	Olio essenziale
<i>Ocimum basilicum</i>	Monti Lattari (NA)	Parti aeree	Olio essenziale
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Monti Lattari (NA)	Parti aeree	Olio essenziale
<i>Salvia officinalis</i>	Monti Lattari (NA)	Parti aeree	Olio essenziale
<i>Thymus pulegioides</i>	Monti Lattari (NA)	Parti aeree	Olio essenziale

CAPITOLO I

Lamiaceae e proprietà biologiche dei composti isolati

1.1 Lamiaceae

1.1.1 Famiglia

Con il nome di Lamiaceae o anche Labiatae si accorpa una vasta ed omogenea famiglia di Dicotiledoni che comprende 200 generi e circa 3200 specie.

Il carattere morfologico più evidente è dato dal lembo della corolla, incurvata sia all'interno sia all'esterno, ricordando la forma di un labbro, da cui il nome "Labiatae".

Sono piante prevalentemente erbacee, annuali o perenni. In qualche raro caso, alcune specie del genere *Hyptis* presentano un abito arboreo, mentre ancora più raro è l'aspetto lianoso per poche specie del genere *Scutellaria*.

Presentano fusto e rami a caratteristica sezione quadrangolare (fig. 1). Le foglie, prive di stipole, sono opposte o verticillate, semplici o pennatosette o pennatocomposte.

I fiori sono ermafroditi, zigomorfi, riuniti in infiorescenze che possono essere a spicastro oppure a verticillastro. La corolla, caratteristica, è bilabiata e si compone di 5 petali: 2 formano il labbro superiore e 3 quello inferiore. L'ovario è supero e quadriloculare. Lo stilo è ginobasico, lo stigma è generalmente bifido. I semi hanno scarso endosperma cellulare, spesso riassorbito durante lo sviluppo embrionale. L'impollinazione è quasi sempre entomogama e, nello specifico, è operata da ditteri ed imenotteri.

Sono piante aromatiche per la presenza, su tutta la pianta, di peli secretori e ghiandole contenenti oli essenziali che conferiscono alle Lamiaceae una provvida

azione stimolante per le mucose e per le ghiandole, ecco perché vengono largamente utilizzate in medicina come toniche, sudorifere e stimolanti.

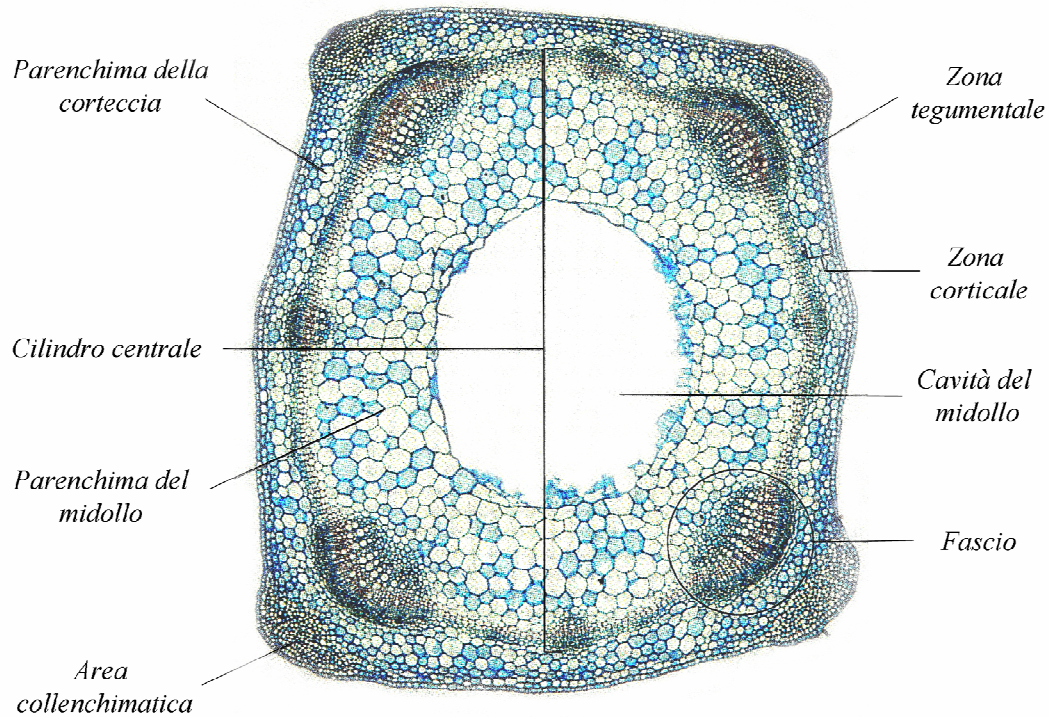


Figura 1. Fusto di Salvia (*Salvia officinalis* L.) sezione trasversale x 25.

Con alcune eccezioni (ad esempio il rosmarino), il fusto delle Lamiaceae è tipicamente a sezione quadrangolare: le quattro costolature sono costituite da cospicui cordoni di collenchima sotto-epidermico. In corrispondenza di tali cordoni, nel cilindro centrale vi sono altrettanti fasci di notevoli dimensioni, alternati ad altri quattro molto più piccoli.

1.1.2 Sistematica delle Lamiaceae

Le Lamiaceae vengono suddivise in otto sottofamiglie:

- 1- *Ajugoideae*, i cui generi principali sono *Ajuga*, *Teucrium* e *Rosmarinum*;
- 2- *Prostantheroideae*;
- 3- *Prasioideae*, rappresentata dai generi *Prasium* e *Gomphostemma*;

4- *Scutellarioideae*;

5- *Lavanduloideae*;

6- *Stachyoideae*, che raggruppa generi molto importanti come *Melissa*, *Thymus*,
Mentha, *Origanum*, *Satureja*, *Marrubium*, *Hyssopus*;

7- *Ocimoideae*, i cui principali generi sono *Ocimum*, della nostra flora spontanea, *Coleus* e *Plectranthus*, propri di altre regioni;

8- *Cathopherioideae*.

I generi indigeni della flora italiana possono essere divisi in due gruppi: *Tetrastemon* in cui gli stami fertili sono quattro, e *Distemon* in cui gli stami fertili sono due (i restanti due sono sterili oppure mancano del tutto).

Tra i generi più importanti per numero di specie ricordiamo: *Salvia* (circa 500 specie), *Hyptis* (circa 300 specie), *Stachys* (circa 200 specie), *Scutellaria* (più di 100 specie). Indubbia è l'affinità delle Lamiaceae con le Verbenaceae, dalle quali si distinguono solo per l'inserzione dello stilo alla base dei lobi ovarici, mentre per le Verbenaceae alla sommità dell'ovario.

Alla luce di quanto detto, i caratteri discriminanti una pianta appartenente a questa famiglia sono: fusti e rami a sezione tetragonale, odore aromatico, ovario supero bicarpellare e quadrilobato, ovuli anatropi e solitari, stilo inserito basalmente ai lobi ovarici. Meno facile risulta, invece, la separazione dei generi, poiché gli elementi discriminanti risiedono spesso nel calice, nella corolla o negli stami.

1.1.3 Distribuzione geografica, habitat ed interesse

Sebbene la loro distribuzione sia cosmopolita, le Lamiaceae sono molto più diffuse nella zona mediterranea, che rappresenta il principale centro di differenziazione della famiglia. Allo stato spontaneo, molte di esse prediligono habitat nemorali, tuttavia la maggior parte preferisce ambienti aperti e soleggiati, entrando nella costituzione di macchie e garighe (*Salvia triloba*), pascoli aridi montani (*Stachys tymphaea*), o pascoli umidi (*Prunella vulgaris*).

Alla base del loro ampio utilizzo vi è una caratteristica istologica che le accomuna: la presenza di ghiandole e peli secretori contenenti oli essenziali lungo l'intera pianta, in particolare sul fusto e sulle foglie. Questo spiega il diffusissimo impiego nell'industria alimentare come aromatizzanti per cibi e bevande (*Mentha piperita*). Gli indigeni dell'Africa centrale raccolgono i piccoli semi di *Hyptis spicigera* per ottenere una gelatina che mescolano alle loro salse ed intingoli nel condimento delle carni.

Le Lamiaceae vengono impiegate dall'industria farmaceutica come piante medicinali. Questa famiglia trova un larghissimo uso anche in profumeria; ad esempio la *Lavandula spica*, oltre ad essere usata come essenza-base nei profumi, protegge lane e pellicce dall'attacco delle tarme.

Ritroviamo molte specie sui davanzali come piante ornamentali per il loro profumo ed il loro piacevole aspetto; tra i vari generi ricordiamo *Cedronella*, *Leontis*, *Ajuga*, *Brunella*, *Lavandula*.

La nostra cultura culinaria si “profuma” di specie quali *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Satureja hortensis*.

I semi oleosi di una Lamiacea dell'Estremo Oriente, la *Perilla frutescens*, forniscono un olio grasso che trova impiego nell'industria cartaria ed in tipografia.

Alla luce di quanto detto, è evidente che la versatilità d'impiego fa delle Lamiaceae una delle famiglie di maggior interesse economico.

1.2 Proprietà biologiche dei composti isolati

Gli organismi vegetali, anche se tra loro diversi per forma, organizzazione ed adattabilità all'ambiente, utilizzano un numero piuttosto limitato di sostanze per i loro processi biochimici. La biosintesi e la degradazione di questi composti costituiscono il metabolismo primario. I vegetali, però, sono spesso capaci di sintetizzare una grande varietà di composti organici il cui significato è chiaro solo in alcuni casi. La biosintesi di questi composti avviene attraverso vie metaboliche che utilizzano prodotti intermedi del metabolismo primario che, per una imperfezione biochimica o per un normale processo fisiologico, si accumulano nelle cellule vegetali. Questo metabolismo, detto secondario, può variare da specie a specie vegetale ed è condizionato da fattori ecologici (relativi all'ambiente) e genetici (relativi al vegetale) e può dar luogo a differenti metaboliti secondari. Questi metaboliti si formano prevalentemente durante il periodo di accrescimento del vegetale, cioè quando le trasformazioni metaboliche raggiungono la massima attività. I principi attivi, contenuti nelle droghe, possono essere rappresentati da costituenti cellulari primari (proteine, lipidi, polisaccaridi), da metaboliti intermedi (acidi organici) o da costituenti cellulari secondari (alcaloidi, glicosidi, flavonoidi, saponine, tannini, essenze). Quest'ultimo gruppo comprende i principi attivi più interessanti da un punto di vista farmacologico (fig. 2).

Sono riportate di seguito, così come descritte in letteratura, alcune delle proprietà biologiche delle classi dei metaboliti secondari isolati dalle piante studiate.

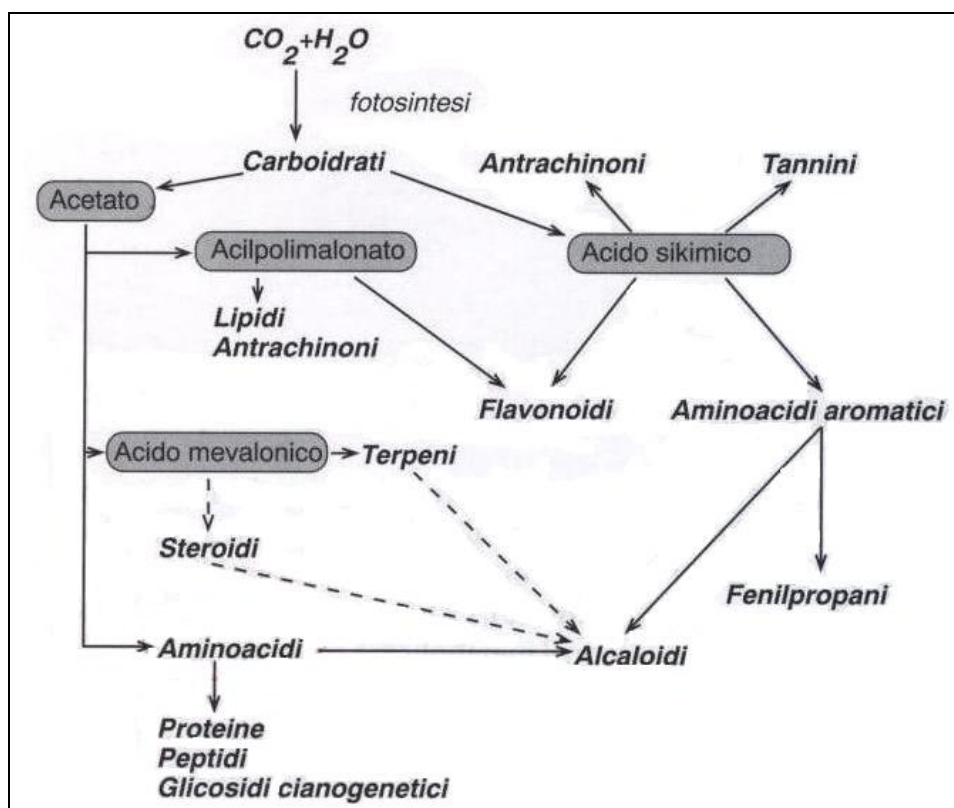


Figura 2. Schema di biosintesi dei principali metaboliti secondari

1.2.1 Terpeni e Diterpeni

I terpeni, la cui origine biosintetica è riportata nella figura 3, sono composti di origine prevalentemente vegetale, presenti nelle piante superiori e nei funghi, e di origine animale (organismi marini). In campo terapeutico trovano applicazione nella cura di patologie dell'apparato respiratorio, gastrointestinale e nervoso.

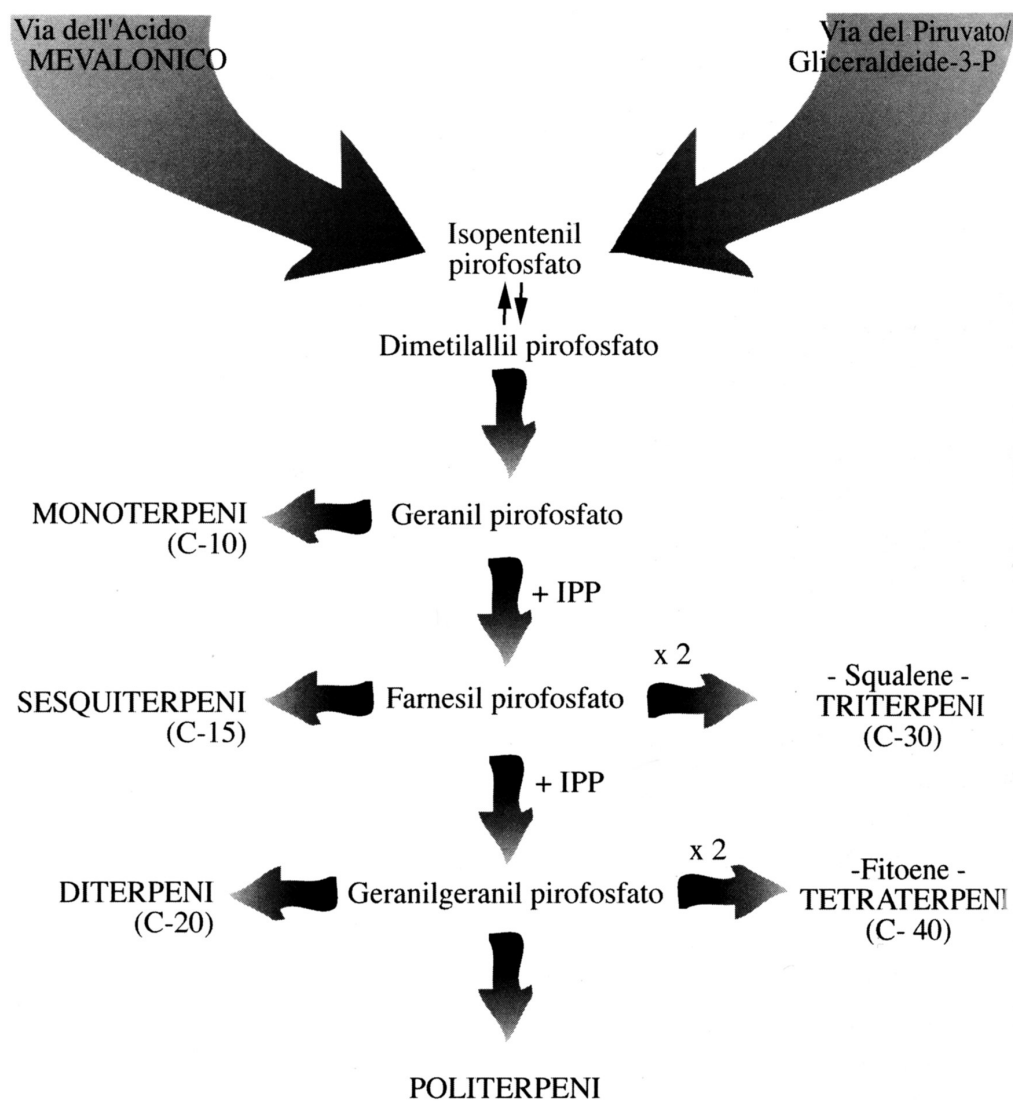


Figura 3. Schema di sintesi dei terpeni

Tutti i terpeni hanno formula bruta multipla di 5 atomi di C, ossia di una unità C-5, detta unità isoprenica; queste si legano tra loro seguendo la legge “testa-coda” e, a seconda di quante unità concorrono a formare i legami, si distinguono in:

- C-5 emiterpeni
- C-10 monoterpeni
- C-15 sesquiterpeni
- C-20 diterpeni
- C-25 sesterterpeni
- C-30 triterpeni
- C-40 tetraterpeni.

I diterpeni derivano dalla condensazione di quattro unità isopreniche; in natura quelli a catena aperta, come il precursore, il geranilgeranil difosfato (GGPP) e il suo isomero geranil linalolo, sono pochi e la maggior parte di essi ha una struttura ciclica. Il fitolo, uno dei diterpeni più semplici ed importanti, è una forma ridotta di geranilgeraniolo che forma la catena laterale delle clorofille e delle vitamine E e K. Le reazioni di ciclizzazione del GGPP attraverso un meccanismo di tipo carbocationico, in aggiunta alle possibili trasposizioni di Wagner-Merweein, consentono di formare un'ampia varietà strutturale di diterpenoidi, un importantissimo esempio è il taxadiene che costituisce lo scheletro del taxolo (paclitaxel) isolato dal *Taxus brevifolia*. Questa molecola è un importante agente antitumorale con un ampio spettro di attività contro alcune forme cancerose resistenti al trattamento con altri farmaci.

Due gruppi di diterpeni sono caratterizzati dalla presenza di una funzione carbossilica: gli acidi resinici e le gibberelline (fig. 4). Gli acidi resinici sono contenuti nell'essudato di alberi come le conifere e svolgono un ruolo protettivo contro le

infezioni e gli attacchi degli insetti; le gibberelline sono un gruppo di ormoni, presenti soprattutto nei semi, che stimolano la crescita delle piante superiori.

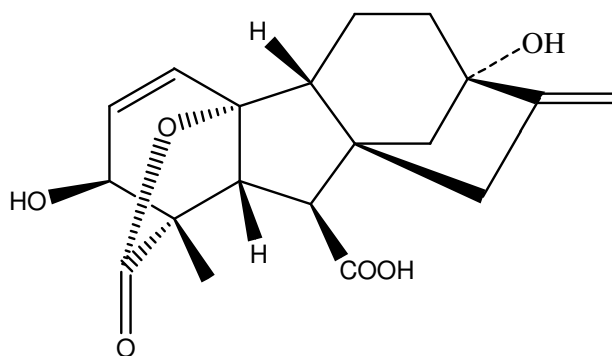


Figura 4. Acido gibberellico (GA₃)

I labdani, con circa 320 composti, rappresentano il gruppo più abbondante di diterpeni. Da un punto di vista chimico tutti i labdani presentano un legame olefinico che coinvolge il C-8, oppure una funzione ossidrilica sul C-8 o nelle sue vicinanze; ciò è in accordo con l'ipotesi biogenetica di tali diterpeni. A questa serie appartengono i diterpeni isolati nell'estratto acetone di *M. globosum* ssp *libanoticum*.

Molti diterpeni possiedono un importante ruolo nella sintesi di sostanze con importantissime proprietà farmacologiche, come la vitamina E (α , β , γ e δ -tocoferolo) che possiede una catena laterale derivante dal fitil difosfato. Essa è un antiossidante ed i suoi principali effetti si esplicano preservando l'integrità vascolare, della muscolatura liscia e del SNC. Tutto ciò supporta il suo ampio utilizzo nel trattamento dei disturbi neuromuscolari, dei disturbi dell'assorbimento dei lipidi, nell'allattamento dei prematuri.

Anche la vitamina K, essenziale per la formazione della protrombina e di altri fattori plasmatici della coagulazione (VII, IX e X), possiede una catena laterale terpenoidica; il suo impiego terapeutico è utile nel trattamento delle emorragie da anticoagulanti orali e nelle emorragie neonatali.

1.2.2 Fenilpropanoidi

Questi composti costituiscono un'ampia classe di prodotti di origine naturale, chiamati anche “fenoli delle piante” per la presenza di uno o più gruppi ossidrilici, che si formano a partire da amminoacidi aromatici quali fenilalanina e tirosina (fig. 5). Questi ultimi si generano dalla via dello shikimato, che fornisce una via alternativa per la produzione di amminoacidi aromatici che è impiegata da piante e microrganismi, ma non da animali.

Da un punto di vista chimico, i fenilpropanoidi sono formati da un anello aromatico a cui è legato un gruppo propionico; in posizione para sull'anello, sono presenti generalmente gruppi ossigenati quali quelli idrossilici, metossilici o metilendiossilici. Tra essi possiamo citare l'acido cinnamico ed i suoi derivati, l'acido caffeico, l'acido ferulico, l'acido *p*-cumarico, le cumarine, i cromoni.

L'acido cinnamico si genera per eliminazione di una molecola di ammoniacca dalla catena laterale della L-fenilalanina, mentre la stessa reazione nella L-tirosina porta alla formazione dell'acido 4-cumarico.

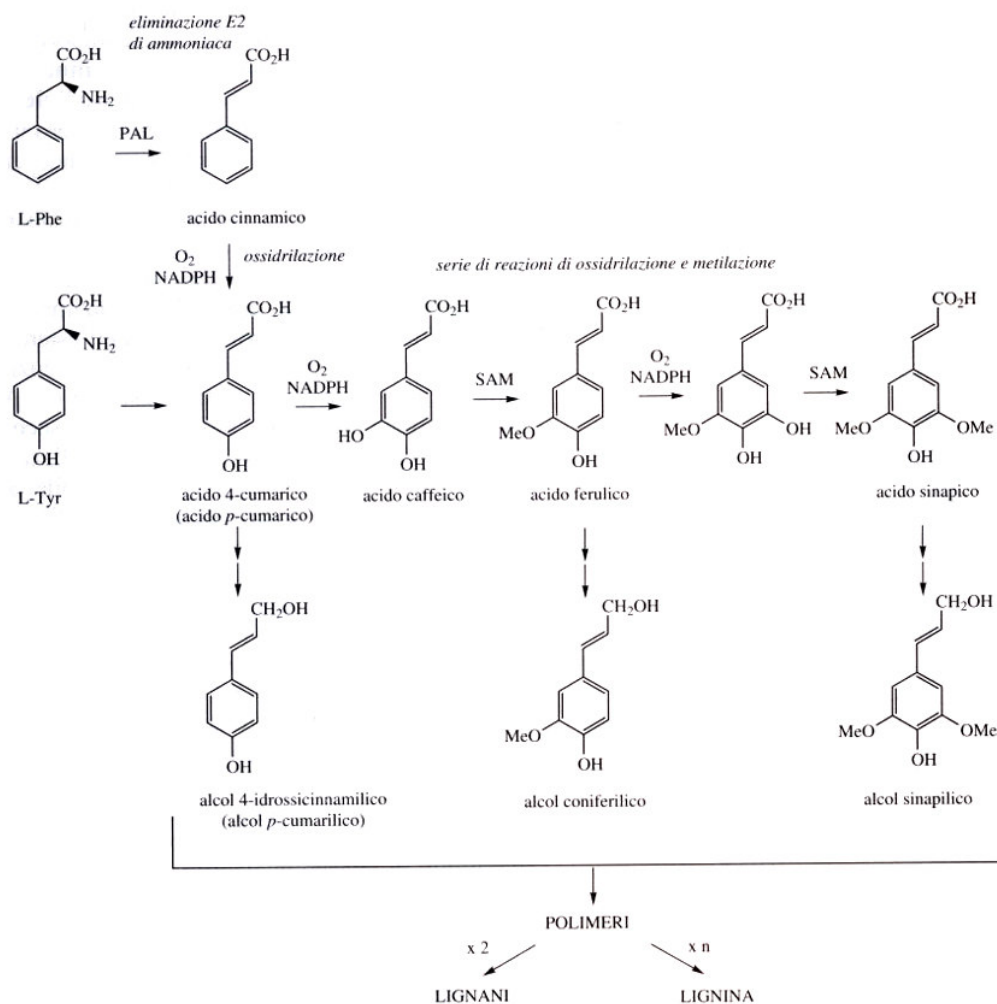


Figura 5. Schema di sintesi dei fenilpropanoidi

Tutte le piante hanno la capacità di deaminare la fenilalanina mediante l'azione di un enzima chiamato fenilalanina ammonia liasi (PAL), ma la corrispondente trasformazione della tirosina è meno comune ed è limitata solo alle piante della famiglia delle Gramineae. Altri acidi cinnamici, come l'acido caffeico e l'acido ferulico, sono ottenuti da ulteriori reazioni di ossidrilazione e metilazione.

Le cumarine, invece, si formano a partire dall'ossidrilazione degli acidi cinnamici in *orto* alla catena laterale. Dalla polimerizzazione dei fenilpropanoidi si ottengono infine lignine e tannini.

Da un punto di vista farmacologico, i fenilpropanoidi sono dotati di attività antisettiche e antiparassitiche e sono utilizzati, in tecnica farmaceutica, come correttivi del sapore. Tra le droghe che contengono tali composti ricordiamo:

- il *balsamo del Perù* che si ricava da *Myroxylon balsamum* (L.) Harms var. *pereirae*; i principali componenti sono esteri dell'acido cinnamico (benzil cinnamato e cinnamil cinnamato) e benzoico (benzil benzoato) che costituiscono il 60-65% del contenuto totale. E' un importante costituente di unguenti e pomate ad azione antisettica, per la sua proprietà astringente si utilizza anche in preparati antiemorroidari.
- Il *balsamo del Tolù* si ottiene dal *Myroxylon balsamum* (L.) Horns. var. *balsamum* e contiene circa l'80% di esteri dell'acido cinnamico con alcol resinosi. Si utilizza come antisettico, espettorante e balsamico in preparati per la gola e per aromatizzare sciroppi medicinali.
- La cinnamaldeide (fig. 6) è il principale componente dell'olio di cannella (*Cinnamonum zeylanicum*) molto usata come aroma in tecnica farmaceutica.

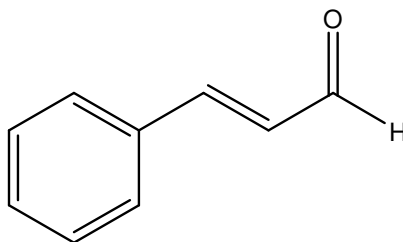


Figura 6. Struttura chimica dell'aldeide cinnamica

1.2.3 Flavonoidi

I flavonoidi costituiscono un gruppo di 4000 composti naturali presenti nelle piante vascolari¹. Sono pigmenti facilmente reperibili nei fiori, nei frutti e nelle foglie di numerose specie vegetali, dove sono peraltro responsabili dei più vivaci colori, che vanno dal giallo per i calconi ed i flavonoli, al rosso, blu e violetto per le antocianidine.

Si tratta di composti di tipo fenolico che possiedono come struttura base, definita aglicone, un benzo- γ -pirano (fig. 7) in cui i due anelli di benzene sono legati tramite un eterociclo dell'ossigeno, che è diverso nei vari tipi di flavonoidi. Questo eterociclo può derivare dal pirano, dal pirilio, dal γ pirone.

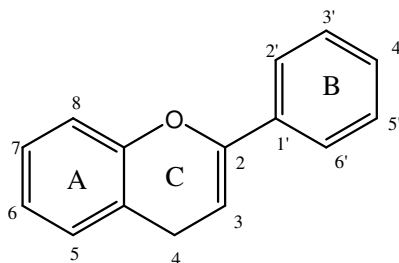


Figura 7. Struttura chimica del Benzo- γ -pirano

La ciclizzazione avviene tra il terzo carbonio della catena e il gruppo ossidrilico dell'anello A in posizione *orto* rispetto alla catena, portando alla formazione di cromano, cromeno e cromone. Nella maggior parte dei casi, l'anello A dei flavonoidi è *meta* diidrossilato o triidrossilato, mentre l'anello B può essere monoidrossilato, *orto* diidrossilato o ancora triidrossilato. Queste differenze sono dovute al fatto che l'anello A si origina dalla via biosintetica dell'acetato, mentre l'anello B deriva dalla via shikimica. I flavonoidi, infatti hanno una via biogenetica mista. Gli acidi cinnamici e i loro esteri con il coenzima A (via dell'acetato) fungono da unità iniziatrici per

l'allungamento di catena con un'unità di malonil CoA (via dello shikimato). Gli enzimi stilbene sintetasi e calcone sintetasi accoppiano un'unità di cinnamoil CoA con tre unità di malonil CoA per dare rispettivamente stilbeni e calconi (fig. 8).

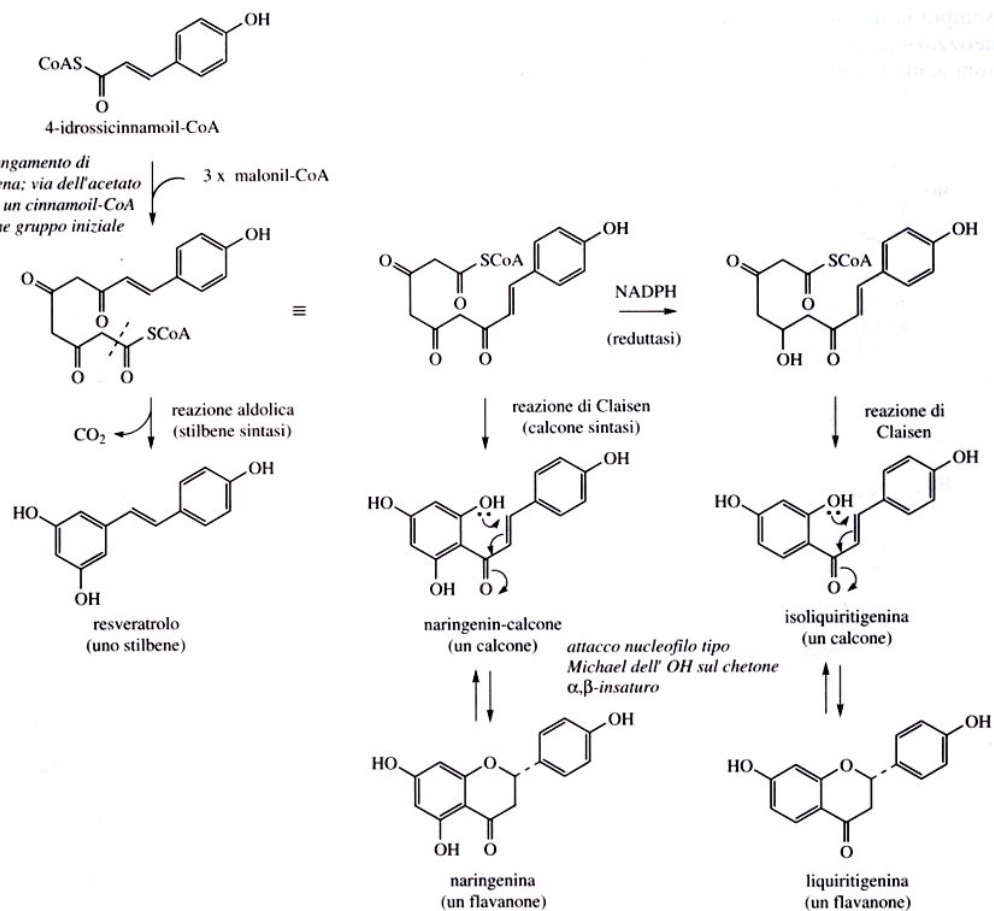


Figura 8. Via biosintetica dei flavonoidi

I calconi fungono da precursori di un'ampia gamma di flavonoidi, che si possono distinguere in (fig. 9):

- flavoni (apigenina, luteolina);
- isoflavoni (daidzeina, genisteina);
- flavonoli (kampferolo, quercitina);
- flavononi (naringenina);
- auroni (ispidolo);
- antocianidine (pelargonidina, cianidina).

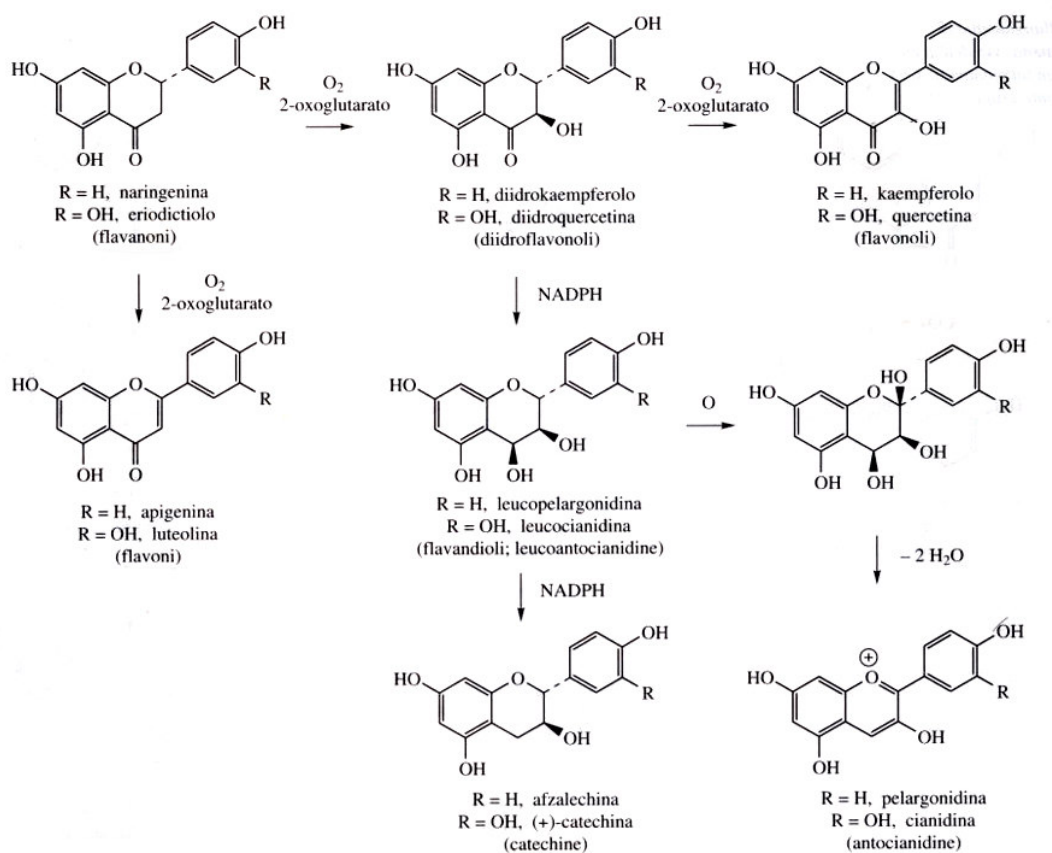


Figura 9. Schema di sintesi delle principali classi di flavonoidi

I flavonoidi possono subire diversi tipi di reazione come addizione, eliminazione, metilazione del gruppo flavonoidico o dei gruppi ossidrilici, dimerizzazione che porta alla formazione di un biflavonoide; quella più importante è sicuramente la glicosilazione. Quest'ultima può avvenire sui gruppi ossidrilici formando flavonoidi *O*-glicosilati o sul gruppo flavonoidico formando flavonoidi *C*-glicosilati. Attualmente si conoscono alcune centinaia di flavonoidi che si differenziano per la porzione zuccherina comunemente rappresentata da glucosio, galattosio, ramnosio e xilosio. Generalmente, questi zuccheri sono legati attraverso legami *O*-glicosidici .

Negli organismi animali, i flavonoidi fungono da trasportatori di idrogeno, infatti una volta che si sono ossidati ad *O*-chinoni, fissano l'idrogeno ritornando al loro stato ridotto².

I flavonoidi mostrano un ampio spettro di attività biologiche e sono contenuti in numerosi cibi e bevande assunti normalmente nella dieta. Ad esempio, i flavonoidi del vino rosso (quercitina, kaempferolo e antocianidine) e del tè (catechine) mostrano un'efficace azione nei confronti di pericolosi radicali liberi; tale azione è dovuta alla natura polifenolica di questi composti che permette loro di catturare radicali superossido ed ossidrilici altamente tossici. I flavonoidi inibiscono *in vitro* la fase iniziale dell'ossidazione lipidica, funzionando come “scavenger” dei radicali ossidrilici e superossido, mentre durante la fase di propagazione cedono atomi di idrogeno ai radicali perossidici³.

Il flavonone esperidina (dalla buccia di *Citrus*), il flavonol glucoside rutina dal grano saraceno (*Fagopyrum esculentum*; Polygonaceae) e la quercetina aumentano la resistenza dei capillari e regolano la loro permeabilità; sono essenziali per la protezione dall'ossidazione della vitamina C; proteggono dalle emorragie e dalle rotture dei

capillari. I flavonoidi mostrano attività antivirale: l'azione più marcata si ha contro i virus della poliomielite, dell'epatite A e B, dell'influenza e dell'HIV. *In vitro*, la quercitina inibisce la replicazione dell'HIV al 100%⁴.

Inoltre è stato osservato che i flavonoidi inibiscono l'aggregazione piastrinica⁵ e gli enzimi ciclossigenasi e lipossigenasi, coinvolti nel metabolismo dell'acido arachidonico⁶.

La quercetina, appartenente alla sottoclasse dei flavonoli, riduce la concentrazione di prostaglandina E₂ (PGE₂) e di leucotriene B₄ (LTB₄) nell'essudato pleurico indotto nei ratti per somministrazione intrapleurica di carragenani all'1%, mentre l'apigenina e la luteolina riducono l'accumulo leucitario e di PGE₂, ma non hanno effetti su LTB₄⁷.

La presenza di gruppi ossidrilici liberi in posizione 5 e 7 o la glicosilazione in posizione 4' è responsabile dell'attività inibitoria dei flavonoidi sulla xantina ossidasi⁸, attività importante per la cura di malattie dovute all'accumulo dell'acido urico come la gotta, e l'ischemia miocardica.

I flavonoidi inoltre hanno la capacità di inibire l'enzima responsabile della formazione di angiotensina, la quale esercita un'azione vasocostrittrice e sodio ritenitiva. Questi composti sono in grado di ritardare lo sviluppo della cataratta in individui che presentano alterazioni congenite del metabolismo degli zuccheri, come accade nei diabetici⁹.

1.2.4 Oli essenziali

Le piante aromatiche hanno tessuti specializzati nella secrezione di metaboliti secondari e situati in parti diverse: radici, rizomi, foglie, fiori. I prodotti di secrezione hanno natura chimica diversa tra loro: cristalli di ossalato di calcio, resine, gomme, mucillagini, terpeni, tannini, latici, pigmenti, oli essenziali.

Questi ultimi sono i secreti più diffusi ed abbondanti, sono formati da miscele di molecole organiche volatili (cioè che evaporano o sublimano facilmente a temperatura ambiente), solubili nei solventi organici ed insolubili in acqua, aventi sapore pungente ed odore caratteristico della pianta che li compone. Le famiglie botaniche più ricche di oli essenziali sono: le *Asteraceae*, le *Lamiaceae*, le *Rutaceae*, le *Liliaceae*, le *Magnoliaceae*, le *Cupressaceae*, le *Pinaceae*.

In base ai gruppi funzionali, i costituenti di un'essenza possono essere raggruppati in quattro categorie principali:

1. idrocarburi non ramificati;
2. derivati del benzene;
3. terpeni aciclici e ciclici;
4. composti vari: ossigenati (aldeidi, chetoni, alcoli, esteri ed acidi), solforati od azotati.

I componenti di un olio essenziale possono poi subire trasformazioni chimiche nel corso dello sviluppo della pianta. Ad esempio, si è constatato che nei primi stadi di vegetazione la pianta presenta, nelle sue parti verdi, un'essenza contenente molti composti a funzione alcolica; durante il periodo di formazione e sviluppo delle infiorescenze, gli acidi liberi che si trovano nella pianta reagiscono con gli alcoli

formando gli esteri, la cui concentrazione aumenta col progredire della fioritura, mentre diminuisce, perché sono rimessi in libertà gli alcoli, quando i fiori appassiscono.

Inoltre, molte sostanze odorose sono presenti nella struttura vegetale sotto forma di glucosidi; successivamente, per scissione di questi, tali sostanze possono entrare in circolo ed essere trasferite nei vari distretti dell'organismo vegetale. Le sostanze odorose compaiono generalmente nelle parti verdi della pianta sin dai primi mesi di vita; poi continuano a formarsi e ad accumularsi fino al principio della fioritura; con il progredire della fioritura, rallenta il loro processo di formazione. Esse, quindi, sono soggette ai fenomeni di diffusione ed osmosi, per cui passano dalle foglie agli steli e di qui alle infiorescenze.

Per un completo studio della formazione ed evoluzione degli oli essenziali nelle piante vanno presi in considerazione alcuni aspetti come: l'effetto della crescita, il momento stagionale, l'influsso climatico. Ad esempio, le piante che crescono in alta montagna, dove le funzioni clorofilliane sono più attive per effetto della maggiore luce, danno oli essenziali più ricchi in esteri di quelle che si trovano ad altitudini minori; ciò è importante perchè il pregio di un'essenza è dato proprio da un'elevata presenza di composti ossigenati.

Non essendo stata riscontrata una loro precisa funzionalità, varie teorie sono state ipotizzate circa la funzione degli oli essenziali nella pianta. Si pensa che gli oli essenziali siano di origine accidentale e non funzionale, pertanto si tratterebbe di prodotti di eliminazione nei processi vitali.

Un'altra ipotesi vuole che le essenze rivestano una funzione di riserva alimentare, ciò sarebbe provato, fra l'altro, dal fatto che nelle piante da essenze, in mancanza di

luce, si verifica una scomparsa quasi completa dei principi odorosi che verrebbero utilizzati al posto dei composti di riserva.

Si ritiene che gli oli essenziali abbiano una notevole importanza per attrarre gli insetti e favorire così l'impollinazione oppure che abbiano anche un ruolo importante nel creare delle “barriere di protezione”. Alcune piante, infatti, sono in grado di produrre difese chimiche sottoforma di sostanze che inibiscono la crescita di individui di altre specie.

La capacità di produrre sostanze tossiche e trattenerle nei tessuti, dunque, fornisce alle piante un enorme vantaggio competitivo paragonabile a quello che per altre piante rappresenta la produzione di spine o foglie coriacee.

I processi estrattivi degli oli essenziali sono molteplici e variano a seconda della natura delle proprietà e del tessuto che contiene l'essenza. Il metodo estrattivo può influenzare notevolmente la composizione e il pregio stesso dell'olio. Le tecniche di preparazione delle essenze sono:

- spremitura;
- distillazione a pressione ridotta o in corrente di vapore (fig. 10);
- estrazione mediante grassi o solventi.: “*Enfleurage*”;
- estrazione con fluidi supercritici.

CAPITOLO II

Genere *Marrubium*

2.1 Botanica ed usi

2.1.1 Descrizione

Il *Marrubio* è un'erba alta da 30 a 60 cm., perenne, odorosa, con fusto eretto, robusto, tetragonale e bianco-lanoso specialmente nella parte inferiore. Le foglie sono opposte, brevemente picciolate, ovato-rotonde, inegualmente crenate, rugoso-crespe, di colore verde-cinerino, pubescenti o villose sulle due pagine (fig. 11).

I fiori sono sessili e zigomorfi, raccolti in verticillastri ascellari, con bratteole lesiniformi e spinescenti. La corolla è bianco-latte, piccola, pubescente. Questa si compone di un labbro superiore bifido, eretto e piano, e di uno inferiore trilobato e patente. Il gineceo ha un ovario quadripartito, l'androceo è composto da quattro stami: i superiori brevissimi, gli inferiori più lunghi; lo stilo è semplice, centrale, caduco, ingrossato all'apice in uno stimma diviso in due lacinie.

Il frutto è composto da quattro nucule arrotondate all'apice, ovali, oblunghe, brune, lisce e glabre.

2.1.2 Generalità

Linneo fa derivare il nome da *Marruvium* o *Marrubium*, l'antica capitale dei Marsi, sulla riva orientale del lago Fucino, oggi S. Benedetto dei Marsi (com. di Pescina, prov. AQ), dove la pianta era abbondante nei terreni paludosi. Secondo altri

Autori il nome deriva dall'ebraico *mar* = amaro e *rob* = succo, “succo amaro”; altri, invece, lo fanno derivare dal latino *marcidum* = vizzo, appassito, per le foglie raggrinzite, bianchicce e dall'aspetto vizzo. Nel Medio Evo era chiamato “seme di Horns”.



Figura 11. *Marrubium vulgare* L.

2.1.3 Distribuzione geografica

Il genere *Marrubium* è costituito da circa cinquanta specie che crescono spontaneamente nella flora del bacino mediterraneo, dell'Europa e dell'Asia extra-tropicale¹⁰ (fig. 12). Anche se è molto diffusa nelle regioni temperate boreali, questa pianta predilige i luoghi aridi, incolti delle zone mediterranee, sia di pianura che di montagna. Cresce tra i ruderi, ai margini delle strade, nei terreni sassosi, negli spazi esposti al sole. Fiorisce in primavera ed in estate.

Tra le specie presenti nel nostro Paese ricordiamo: *M. vulgare*, comune in tutta la penisola; il *M. alysson*, che cresce solo in prossimità degli ulivi in Puglia ed in Sardegna; *M. peregrinum*, oggi estremamente raro, ritrovato in pochissime località del Veneto e della Liguria; *M. candidissimum*, che cresce nell'Italia settentrionale, centrale e nel Gargano.

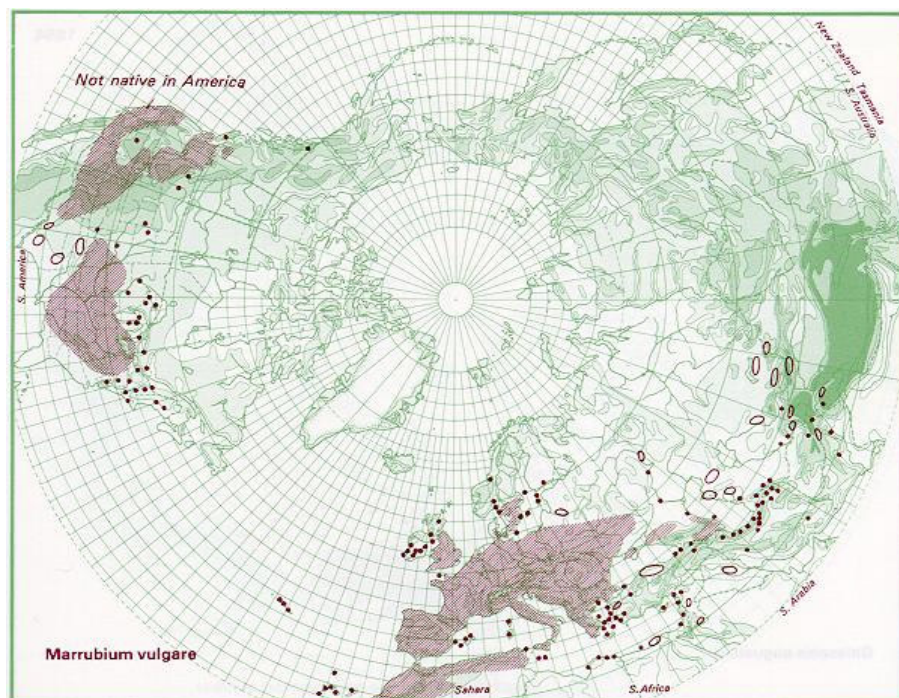


Figura 12. Distribuzione geografica del genere *Marrubium*

2.1.4 Proprieta' farmacologiche ed impiego terapeutico

Il Marrubio era noto ai sacerdoti egiziani e figurava tra le droghe usate nei sacrifici offerti ad alcune divinità. Dalla liturgia egiziana passò poi alla medicina greco-romana e, più tardi, a quella araba, come apprezzato rimedio balsamico, bechico ed espettorante, ritenuto utile in numerose affezioni dell'apparato respiratorio.

Come tale venne conservato nella medicina medioevale; nell'Età moderna, vennero riconosciute a questa droga altre attività quali quella:

- antitermica e modificatrice delle funzioni digestive ed epatiche;
- balsamica, bechica ed espettorante;
- amaro-tonica, eupeptica e colagoga;
- antiaritmica.

Studi recenti hanno evidenziato anche un'attività antiinfiammatoria, ipoglicemizzante ed antipertensiva del *Marrubium vulgare*¹¹⁻¹³. Nel 2002 è stata dimostrata l'azione inibitoria sulle COX-2 e sulle COX-1 degli esteri fenilpropanoici isolati e caratterizzati dall'estratto idroalcolico di *M. vulgare*¹¹. Si è rilevato, inoltre, che l'estratto alcolico di *M.vulgare*, somministrato per via intragastrica in ratti diabetici, ha abbassato significativamente i livelli ematici di glucosio¹². Infine, lavori condotti nel 2001, hanno dimostrato che la somministrazione orale dell'estratto acquoso di *M. vulgare* ha ridotto la pressione sistolica degli SHR (spontaneously hypertensive rats) lasciando, invece, inalterata quella dei ratti normotesi¹³.

Il genere è conosciuto perché è ricco in diterpeni, il più conosciuto ed uno dei primi ad essere stato isolato e caratterizzato è la marrubina¹⁴ che mostra uno scheletro di tipo labdanico. Sebbene siano stati condotti già degli studi fitochimici su alcune specie del genere *Marrubium*, nessuno studio è stato praticato su *Marrubium globosum* ssp.

libanoticum, mentre solo in un'altra sottospecie, il *M. globosum* ssp. *globosum* raccolto in Turchia sono stati individuati alcuni diterpeni labdanici nell'estratto metanolico¹⁵ ma non è stata riportata alcuna informazione sulle proprietà farmacologiche dell'estratto e dei componenti.

2.2 Estrazione ed isolamento di diterpeni labdanici da *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*

2.2.1 Caratteristiche del campione

Le parti aeree di *Marrubium globosum* Montbr. et Auch. ex Benth. ssp. *libanoticum* (Boiss) Davis. Sono state raccolte dalle piante in fioritura nell'Agosto 2002 a Col de Cèdres (Libano), a 2340 m sul livello del mare. Un campione è depositato nel "Herbarium Neapolitanum" (NAP # 23), Dipartimento di Biologia Vegetale, Università degli Studi di Napoli "Federico II". Si è proceduto all'analisi dopo aver essiccato e quindi polverizzato il campione.

2.2.2 Estrazione ed isolamento

La matrice vegetale essiccata e finemente polverizzata (243.6 g) è stata posta a macerare in acetone a temperatura ambiente, cambiando cinque volte il solvente. Gli estratti sono stati riuniti ed il solvente è stato allontanato completamente a pressione ridotta e a temperatura ambiente.

Il residuo gommoso così ottenuto (14.42 g) è stato in parte (10%) utilizzato per effettuare saggi per valutare l'attività antinfiammatoria, il resto, solubilizzato in CHCl₃,

è stato cromatografato su una colonna impaccata con silice disattivata con H₂O (15%)
L'eluizione è stata effettuata a gradiente iniziando con il 100% di *n*-esano ed incrementando gradualmente la polarità mediante l'utilizzo di AcOEt. Abbiamo così ottenuto 28 frazioni da 100 ml ciascuna.

Le frazioni ottenute sono state analizzate mediante TLC (fig. 13) utilizzando come eluente *n*-esano-AcOEt (1:1 vv); per la rilevazione è stata utilizzata una soluzione di solfato di cerio (IV) acida per H₂SO₄. Le frazioni sono state riunite in base alla loro omogeneità cromatografica ottenendo così le riunioni:

A (1-4; 4.5514 g); **B** (5; 0.2678 g); **C** (6-8; 1.0264 g); **D** (9-12; 0.930 g); **E** (13-14; 0.3453 g); **F** (15-16; 0.3749 g); **G** (17-18; 0.7066 g); **H** (19; 0.175 g); **I** (20; 0.066 g); **L** (21-22; 0.2477 g); **M** (23-27; 1.670 g); **N** (28; 1.5 g).



Figura 13. TLC delle 28 frazioni ottenute mediante cromatografia su Si-gel.

Le riunioni **E**, **F**, **L** ed **M** che nei saggi antiinfiammatori preliminari mostravano una maggiore attività, sono state ulteriormente frazionate mediante cromatografia HPLC a fase diretta, utilizzando come eluente una miscela AcOEt/*n*-esano 50:50 per la riunione **E**, una miscela AcOEt/*n*-esano 60:40 per la **F**, una miscela AcOEt/*n*-esano 65:35 per la **L** ed infine una miscela AcOEt/*n*-esano 40:60 per la riunione. **M**.

Dalla purificazione della riunione **E** abbiamo ottenuto 14.1 mg di una subfrazione (Rt. 3') che apparentemente sembrava omogenea, ma che mostrava negli spettri ^1H e ^{13}C NMR vari segnali sdoppiati. Tale fatto indicava la presenza di una miscela irrisolvibile (3:2) di due composti isomeri con formula molecolare $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_5$ come indicato dall'analisi elementare e dagli spettri ESI-MS. Infatti lo spettro ^1H NMR mostrava la presenza per entrambi i composti di due gruppi metilici terziari (a δ 1.29 s e δ 1.05 per entrambi i composti), di un gruppo metilico secondario (due doppietti a δ 0.88 e a δ 0.86) di un metino recante un ossigeno (δ 4.70 m) e due coppie di sistemi AB: il primo a 2.92 d e 2.59 d con $J = 17.2$ Hz, e δ 4.27 d e δ 4.14 d con una $J = 9.2$ Hz per il composto presente in quantità maggiore; il secondo a δ 2.83 d e a δ 2.56 d con una $J = 17.2$ Hz, e δ 4.40 d e δ 4.22 d con una $J = 9.2$ Hz per il composto minoritario. Lo spettro ^{13}C NMR indicava la presenza per entrambi i composti, di due gruppi carbonilici lattonici (δ 183.40 x 2, δ 174.63/174.46), quattro carboni quaternari, due dei quali legati ad un ossigeno (δ 92.25/92.04 e δ 86.03 x 2), tre metini, otto metileni e confermava la presenza di tre gruppi metilici. E' rilevante notare che la differenza di *chemical shift* di quasi tutti i carboni dei due composti è molto piccola, con la sola eccezione del metilene a δ 41.91 e δ 43.02. Tutti questi dati ci hanno permesso di assegnare ai due composti rispettivamente le due strutture **1** e **2**, epimeriche in C-13.

Dalla purificazione della riunione **F** abbiamo ottenuto una subfrazione (50.1 mg, Rt. 9') che appariva omogenea ma, i cui spettri ^1H NMR e ^{13}C NMR analogamente a quanto accaduto per la subfrazione precedentemente trattata, mostravano vari segnali sdoppiati indicando la presenza di una miscela irrisolvibile (11:9) di due composti. L'analisi elementare e gli spettri ESI-MS provavano che i prodotti erano isomeri con la formula molecolare $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_5$. Dal confronto dei dati NMR con quelli riportati in

letteratura, abbiamo identificato i due composti come cyllenina A (**3**) e 15-*epi*-cyllenina A (**4**)¹⁶. Al fine di caratterizzare con certezza i composti **3** e **4**, abbiamo trattato la miscela con MeOH in AcOH, ottenendo i corrispondenti acetali epimerici **5** e **6** (fig. 14) la cui stereoisomeria in C-15 è stata assegnata tramite il confronto dei dati con quelli riportati in letteratura per composti aventi la porzione C-11/C-16 identica¹⁷. I prodotti acetalici ottenuti sono stati separati mediante cromatografia su colonna, permettendoci di identificare i composti **3** e **4** in maniera univoca, rispettivamente come cyllenina A (**3**) e 15-*epi*-cyllenina A (**4**). Infatti, dal momento che i soli dati ¹H e ¹³C NMR non erano sufficienti ad escludere una possibile stereoisomeria di tipo 13*S*, un esperimento ROESY (fig. 15) è stato effettuato sul composto **5**. NOE diagnostici tra l'H-16 a δ 4.02 d e δ 3.85 d ed il metile 17 a δ 0.83 d confermavano chiaramente la stereochimica 13*R*.

Per confermare in modo rigoroso la configurazione del C-13 dei composti **1** e **2**, abbiamo ossidato la miscela dei composti **3** e **4** con PDC in CH₂Cl₂. Si è ottenuto il derivato 15-oxo, identico al composto **2**. Questa reazione ci ha permesso quindi di assegnare con sicurezza la stereochimica 13*R* al prodotto **2** e 13*S* al prodotto **1**.

Ad un altro prodotto della riunione **F** (7.7 mg, Rt. 6.5') è stata assegnata, tramite metodi spettrali (UV, ESI-MS in modalità positiva ed esperimenti NMR omo ed eteronucleari 1D e 2D) e confronto con i dati presenti in letteratura per composti simili la struttura **7**. Tale composto, in particolare, è risultato essere il deacetil derivato del vitexilattone, un diterpene labdanico isolato da *Vitex rotundifolia*¹⁸. Infatti la sua analisi elementare ed ESI-MS erano in accordo con la formula molecolare C₂₀H₃₂O₄. I dati degli spettri ¹H e ¹³C NMR mostravano segnali per tre gruppi metilici terziari, un gruppo metilico secondario, un γ-lattone α,β insaturo (δ_H= 4.76 d, 2H, H16; δ_C= 73.17 t,

C-16; $\delta_{\text{H}}=5.84$ dddd, 1H, H 14; $\delta_{\text{C}} = 114.93$ d, C-14; $\delta_{\text{C}} = 174.07$ s, C-15) e un metino ($\delta_{\text{C}}= 67.34$ d, C-6; $\delta_{\text{H}}= 4.36$ ddd, 1H, H-6) recante un ossidrilico libero in β .

La purificazione della riunione **L** ha portato all'isolamento del composto maggioritario **8** (25 mg, Rt.5'), la cui struttura è stata determinata mediante metodi spettrali. Infatti lo spettro di massa era in accordo con la formula molecolare $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_5$. Gli spettri ^1H e ^{13}C NMR mostravano segnali per tre gruppi metilici, un γ -lattone α,β insaturo ($\delta_{\text{H}}= 4.75$ s, 2H, H 16; $\delta_{\text{C}} = 73.34$ t, C-16; $\delta_{\text{H}} = 5.83$ s, 1H, H 14; $\delta_{\text{C}} = 115.32$ d, C-14; $\delta = 174.10$ s, C-15) ed un γ -lattone coinvolgente il C-19 ($\delta_{\text{C}} = 183.76$ s) e il C-6 ($\delta_{\text{C}} = 76.02$ d; $\delta_{\text{H}} = 4.73$ m, 1H, H 6). Dalla letteratura si evince che tale composto era già stato descritto come derivato sintetico preparato a partire da un prodotto naturale, ma mai completamente caratterizzato¹⁹.

La purificazione della riunione **M** ha portato all'isolamento del composto **9** (5.8 mg Rt. 4.5'). Esso mostrava una formula molecolare $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_5$ e i suoi dati ^1H e ^{13}C NMR indicavano, per il nucleo decalinico, la medesima funzionalizzazione della cyllenina A (**3**) e della 15-*epi*-cyllenina A (**4**): due gruppi metilici terziari a δ 1.29 (s) e δ 1.04 (s), un gruppo metilico secondario a δ 0.92 (d) ($J = 6$ Hz) e un γ lattone saturo coinvolgente il C-19 ($\delta_{\text{C}} = 184.01$ s) ed il C-6 ($\delta_{\text{C}} = 76.28$ d, C-6; $\delta_{\text{H}} = 4.74$ dd, 1H, H-6). Inoltre, la presenza di un gruppo carbossilico e del suo gruppo α -metilenico era chiaramente indicata rispettivamente dai segnali a $\delta_{\text{C}} 177.44$ e $\delta_{\text{C}} = 34.10$ t, C-13; $\delta_{\text{H}} = 2.39$ t, 2H, H-13. Queste informazioni ci permettevano di assegnare a questo composto, a cui abbiamo attribuito il nome comune di acido marrulanico, la struttura di-nor labdanica descritta dalla formula **9**.

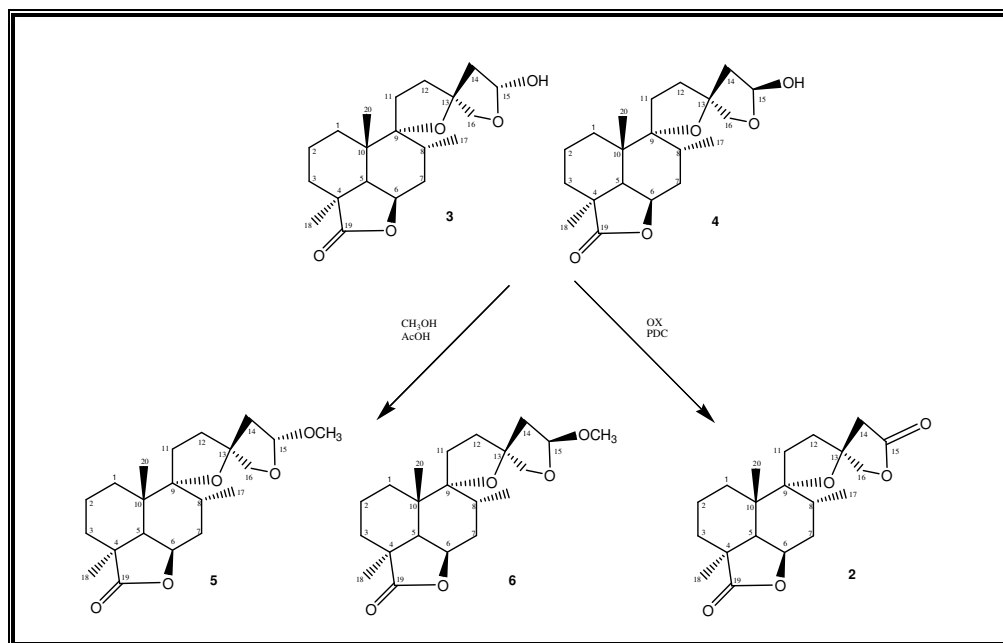


Figura 14. Reazioni praticate sui composti 3 e 4.

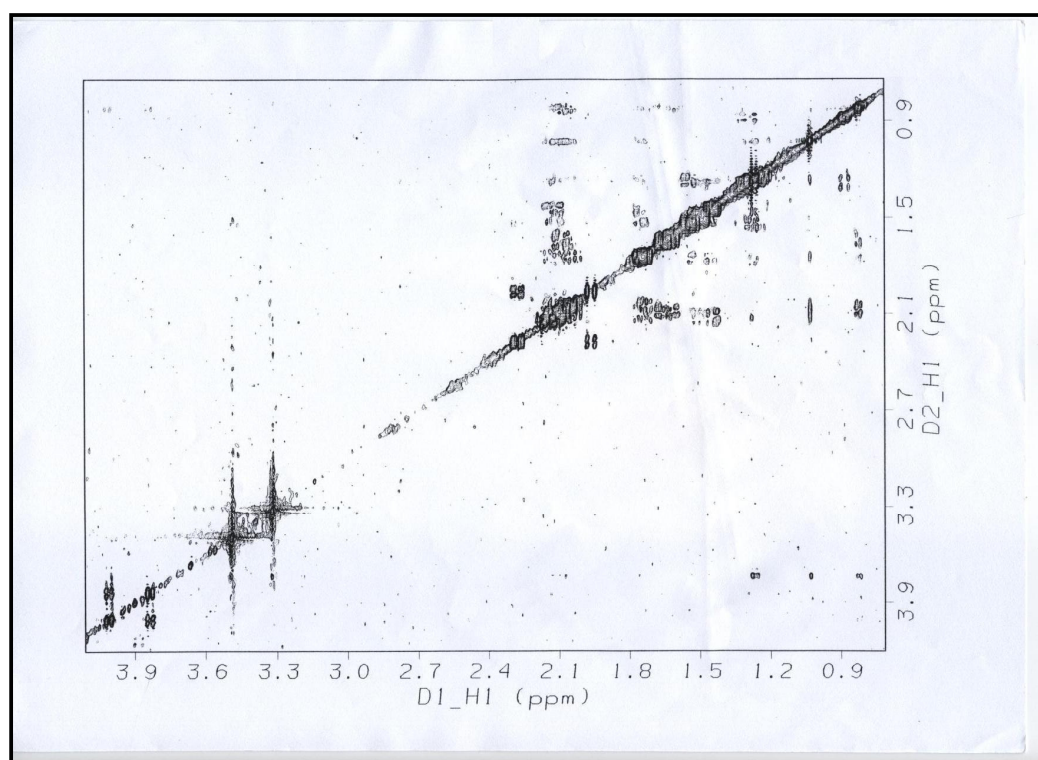


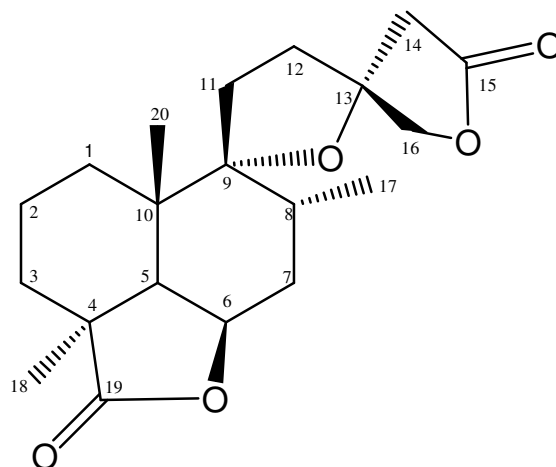
Figura 15. Particolare dello spettro ROESY effettuato sul composto 5

2.2.3 Caratterizzazione dei composti

2.2.3a Composto **1**

Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 371 $[M+Na]^+$ (100). Analisi elementare: calcolata per $C_{20}H_{28}O_5$ C 68.94%, H 8.10%; trovata C 68.90%, H 8.14%.

1H NMR ($CDCl_3$ 400 MHz): vedi tab. 2. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.7 MHz): vedi tab. 2.



Composto 1

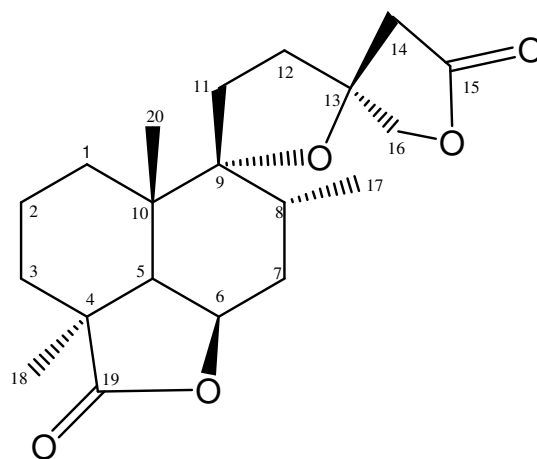
Tabella 2. Dati NMR relativi al composto **1** (in CDCl₃)

Composto 1			
protoni	δ_H	carboni	δ_C
1°	1.24	1	29.27
1b	1.24		
2a	1.78	2	17.94
2b	1.50		
3a	2.11	3	28.07
3b	1.42		
4	-	4	44.00
5	2.08	5	45.97
6 α	4.70 m	6	75.93
7a	2.08	7	31.68
7b	1.61		
8 β	2.18	8	31.83
9	-	9	92.25
10	-	10	38.91
11a	2.08	11	28.83
11b	1.83		
12a	2.10	12	36.94
12b	2.10		
13	-	13	86.03
14a	2.92 d (17.2)	14	41.91
14b	2.59 d (17.2)		
15	-	15	174.63
16a	4.27 d (9.2)	16	78.60
16b	4.14 d (9.2)		
17	0.88 d (6.4)	17	17.36
18	1.29 s	18	23.04
19	-	19	183.40
20	1.05 s	20	23.36

2.2.3b Composto 2

Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 371 $[M+Na]^+$ (100). Analisi elementare: calcolata per $C_{20}H_{28}O_5$ C 68.94%, H 8.10%; trovata C 68.90%, H 8.14%.

1H NMR ($CDCl_3$ 400 MHz): vedi tab. 3. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.7 MHz): vedi tab. 3.



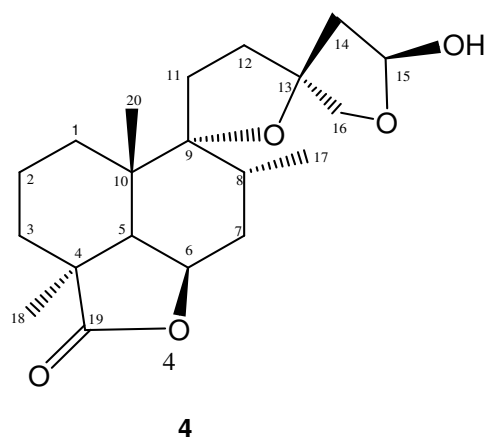
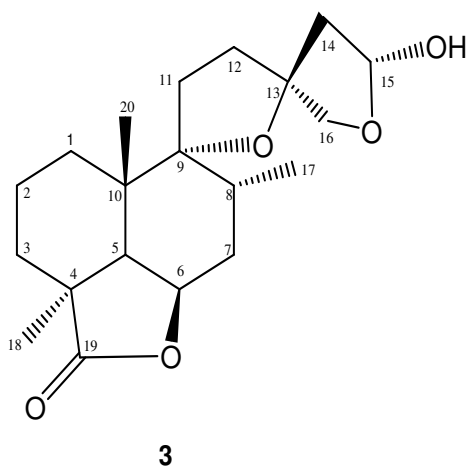
Composto 2

Tabella 3 Dati NMR relativi al composto **2** (in CDCl₃)

Composto 2			
protoni	δ_H	carboni	δ_C
1a	1.24	1	29.27
1b	1.24		
2a	1.78	2	17.89
2b	1.50		
3a	2.11	3	28.07
3b	1.42		
4	-	4	44.00
5	2.08	5	45.93
6 α	4.70 m	6	75.93
7a	2.08	7	31.59
7b	1.61		
8 β	2.18	8	31.86
9	-	9	92.04
10	-	10	39.01
11a	2.08	11	29.01
11b	1.83		
12a	2.10	12	36.94
12b	2.10		
13	-	13	86.03
14a	2.83 d (17.2)	14	43.02
14b	2.56 d (17.2)		
15	-	15	174.46
16a	4.40 d (9.2)	16	78.30
16b	4.22 d (9.2)		
17	0.86 d (6.4)	17	17.33
18	1.29 s	18	23.02
19	-	19	183.40
20	1.05 s	20	23.36

2.2.3c Cyllenina A (**3**) e 15-*epi*-cyllenina A (**4**)

Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 389 $[M+K]^+$ (61) 373 $[M+Na]^+$ (100) 351 $[M+H]^+$ (37). Analisi elementare: calcolata per $C_{20}H_{30}O_5$, C 68.54%, H 8.63%; trovata C 68.52%, H 8.67%. 1H NMR ($CDCl_3$, 400MHz): vedi tab. 4 e 5. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.7 MHz): vedi tab. 4 e 5.



Composto 3 (cyllenina A) e **Composto 4** (15-*epi*-cyllenina A)

Tabella 4. Dati NMR relativi al composto **3** in miscela.(in CDCl₃)

Composto 3:cyllenina A			
protoni	δ_H	carboni	δ_C
1a	1.52	1	28.95 t
1b	1.28		
2a	1.70	2	17.79 t
2b	1.48		
3a	2.10	3	28.01 t
3b	1.42		
4	-	4	44.02 s
5	1.91 d (3.6)	5	46.42 d
6 α	4.68 dd (4.4, 3.6)	6	75.94 d
7a	2.08	7	31.72 t
7b	1.62		
8 β	2.08	8	31.78 d
9	-	9	92.09 s
10	-	10	39.06 s
11a	2.08	11	29.42 t
11b	1.78		
12a	2.09	12	34.58 t
12b	1.92		
13	-	13	90.12 s
14a	2.26 brd (12)	14	45.77 t
14b	2.09		
15 α	-	15	99.27 d
15 β	5.42 m		
16a	4.21 d (7.2)	16	77.16 t
16b	3.71 d (7.2)		
17	0.87 d (5.2)	17	17.38 q
18	1.26 s	18	23.11 q
19	-	19	183.42 s
20	1.04 s	20	23.42 q

Tabella 5: Dati NMR relativi al composto **4** in miscela.(in CDCl₃)

Composto 4; 15-<i>epi</i>-cyllenina A			
protoni	δ_H	carboni	δ_C
1a	1.52	1	28.79 t
1b	1.28		
2a	1.70	2	18.00 t
2b	1.48		
3a	2.10	3	28.15 t
3b	1.42		
4	-	4	44.00 s
5	1.91 d (3.6)	5	46.36 d
6 α	4.68 dd (4.4, 3.6)	6	76.37 d
7a	2.08	7	31.69 t
7b	1.62		
8 β	2.08	8	31.85 s
9	-	9	90.54 s
10	-	10	38.89 s
11a	2.08	11	29.61 t
11b	1.78		
12a	2.18	12	37.73 t
12b	2.09		
13	-	13	89.97 s
14a	2.29 dd (12.0, 4.4)	14	48.62 t
14b	1.95		
15 α	5.61 d (4.4)	15	99.15 d
15 β	-		
16a	3.99 d (7.2)	16	77.64 t
16b	3.97 d (7.2)		
17	0.81 d (5.2)	17	17.25 q
18	1.26 s	18	22.88 q
19	-	19	183.78 s
20	1.02 s	20	23.61 q

2.2.3d Composti **5** e **6**

30 mg della miscela di cyllenina A (**3**) e 15-*epi*-cyllenina A (**4**) sono stati solubilizzati in 2 ml di una miscela 1:1 di AcOH e MeOH e lasciati a temperatura ambiente per una notte per dare una miscela di due composti che sono stati separati mediante cromatografia su colonna (Si gel, *n*-esano/EtOAc 1:1 come eluente). Si sono ottenuti così 13 mg di 15-metossi-cyllenina A (**5**) e 10 mg di 15-metossi-15-*epi*-cyllenina A (**6**).

2.2.3d_a 15-Metossi-cyllenina A (**5**)

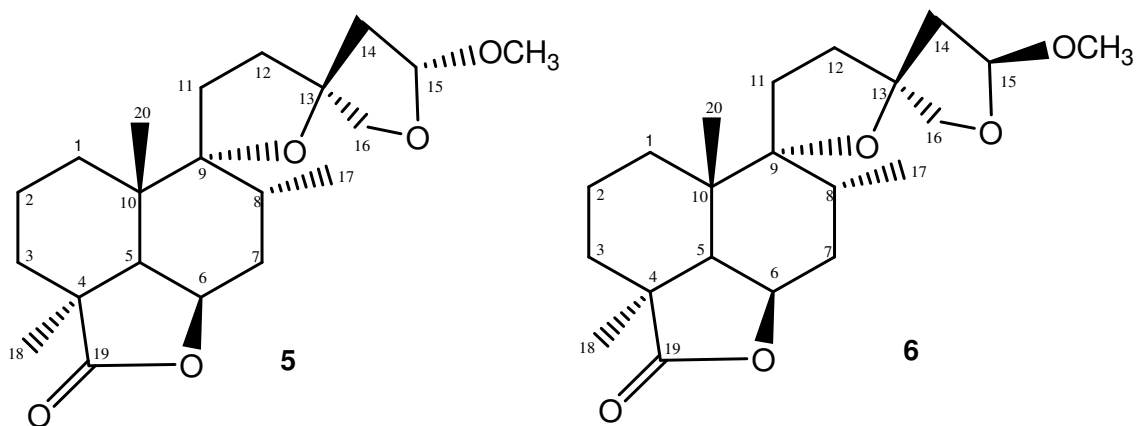
Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 365 $[M+H]^+$ (100). Analisi elementare: calcolata per $C_{21}H_{32}O_5$ C 69.20%, H 8.85%; trovata C 69.23%, H 8.86%. 1H NMR ($CDCl_3$ 400MHz) δ 5.10 (1H, d, $J = 5.6$ Hz, H-15 β), 4.70 (1H, dd, $J = 4.4, 3.6$ Hz, H-6), 4.02 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-16a), 3.85 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-16b), 3.32 (3H, s, OMe), 2.28 (1H, dd, $J = 13.2, 5.6$ Hz, H-14a), 1.96 (1H, d, $J = 13.2$ Hz, H-14b), 1.27 (3H, s, Me-18), 1.03 (3H, s, Me-20), 0.83 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, Me-17); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.7 MHz): vedi tab. 6.

2.2.3d_b 15-Metossi-15-*epi*-cyllenina A (**6**)

Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 365 $[M+H]^+$ (100). Analisi elementare: calcolata per $C_{21}H_{32}O_5$ C 69.20%, H 8.85%; trovata C 69.23%, H 8.86%. 1H NMR ($CDCl_3$ 400MHz) δ 4.97 (1H, dd, $J = 6.0, 3.6$ Hz, H-15 α), 4.69 (1H, dd, $J = 4.4, 3.6$ Hz, H-6), 3.92 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-16a), 3.60 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-16b), 3.39 (3H, s, OMe), 2.22 (1H, dd, $J = 13.6, 6.0$ Hz, H-14a), 1.26 (3H, s, Me-18), 1.02 (3H, s, Me-20), 0.81 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, Me-17); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.7 MHz): vedi tab. 6.

2.2.3d_c Composto **2**

Il trattamento di 30 mg della miscela di cyllenina A (**3**) e 15-*epi*-cyllenina A (**4**) con 1.2 equiv di PDC (38 mg) in CH₂Cl₂ sotto agitazione per 24 h, dopo purificazione mediante cromatografia su colonna (Si gel, 7:3 *n*-esano/EtOAc come eluente), dava 20 mg del composto **2** precedentemente descritto.



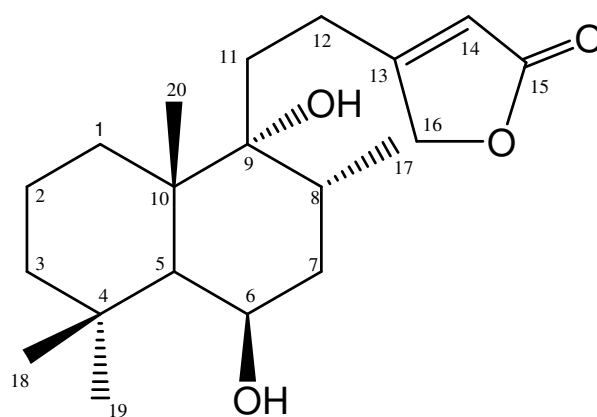
Composto 5 (15 metossi c. A) e **Composto 6** (15 metossi 15-*epi*-c. A)

Tabella 6. Dati ^{13}C NMR relativi ai composti **5** e **6** in miscela.(in CDCl_3)

Carbonio	5	6
1	28.97 t	28.63 t
2	18.11 t	17.83 t
3	28.32 t	28.17 t
4	44.09 s	43.96 s
5	45.96 d	45.68 d
6	76.80 d	76.36 d
7	31.89 t	31.43 t
8	32.02 d	31.95 d
9	90.72 s	90.02 s
10	39.05 s	39.04 s
11	29.72 t	29.04 t
12	37.78 t	39.56 t
13	90.19 s	89.31 s
14	48.41 t	47.40 t
15	105.71 d	105.04 d
16	77.49 t	75.19 t
17	17.35 q	16.87 q
18	23.01 q	23.04 q
19	183.70 s	183.85 s
20	23.77 q	23.16 q
OCH_3	54.75 q	55.21 q

2.2.3e Composto **7** (6-deacetilvitexilattone)

Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 375 $[M+K]^+$ (100), 359 $[M+Na]^+$ (100) 337 $[M+H]^+$ (52). Analisi elementare: calcolata per $C_{20}H_{32}O_4$ C 71.39%, H 9.59%; trovata C 71.35%, H 9.60%. 1H NMR ($CDCl_3$ 400MHz): vedi tabella 7. Il ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.7 MHz).vedi tab. 7.



Composto 7 (6-deacetilvitexilattone)

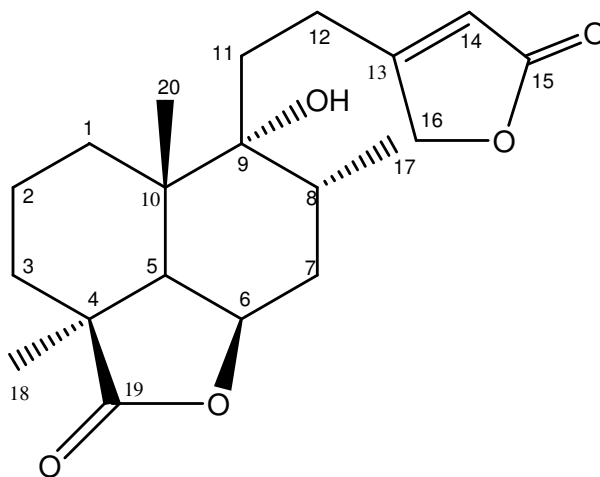
Tabella 7. Dati NMR relativi al composto **7** (in CDCl₃)

Composto 7: deacetil vitexilattone			
protoni	δ_H	carboni	δ_C
1a	2.28 m	1	34.27 t
1b	1.50 m		
2a	1.48 m	2	18.63 t
2b	0.90 m		
3a	1.35 m	3	43.67 t
3b	1.15 m		
4	-	4	34.78 s
5	1.36	5	48.81 d
6 α	4.36 ddd (2.0,2.0,2.0)	6	67.34 d
7a	1.60 m	7	40.19 t
7b	1.48 m		
8 β	2.28 m	8	31.35 d
9	-	9	75.90 s
10	-	10	43.59 s
11a	1.98 m	11	31.67 t
11b	1.72 m		
12a	2.50 m	12	25.42 t
12b	1.35 m		
13	-	13	171.27 s
14	5.84 dddd (1.2, 1.2, 1.2, 1.2)	14	114.93 d
15	-		174.07 s
16a	4.76 d (1.2)	16	73.17 t
16b			
17	0.93 d (6.8)	17	16.24 q
18	1.24 s	18	24.63 q
19	0.99 s	19	33.78 q
20	1.28	20	19.42 q

2.2.3f Composto **8** (marrulibanoside)

Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 349.2 $[M+H]^+$ (100). Analisi elementare: calcolata per $C_{20}H_{28}O_5$ C 68.94%, H 8.10%; trovata C 68.99%, H 8.05%.

1H NMR ($CDCl_3$ 400MHz): vedi Tabella 8, ^{13}C NMR ($CDCl_3$ 100.7 MHz): vedi tab. 8.



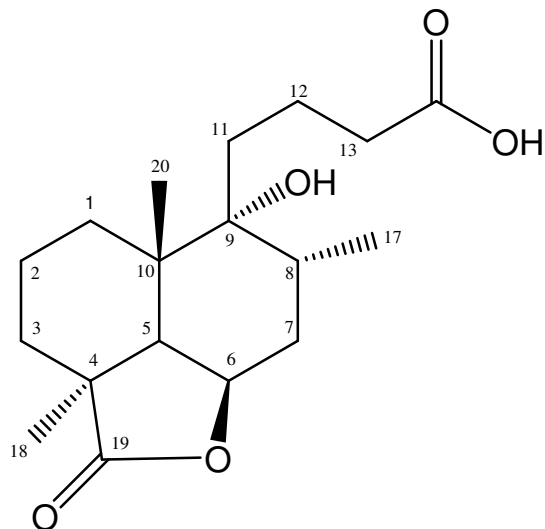
Composto 8 (marrulibanoside)

Tabella 8. Dati NMR relativi al composto **8** (in CDCl₃)

Composto 8: marrulibanoside			
protoni	δ_H	carboni	δ_C
1a	1.79 m	1	28.92 t
1b	1.28 m		
2a	1.75 m	2	18.30 t
2b	1.51 m		
3a	2.10 m	3	28.48 t
3b	1.46 m		
4	-	4	44.02 s
5	2.20 d (4.5)	5	45.01 d
6 α	4.73 m	6	76.02 d
7a	2.16 m	7	32.42 t
7b	1.68 m		
8 β	2.15 m	8	31.59 d
9	-	9	75.56 s
10	-	10	40.05 s
11a	1.90	11	32.54 t
11b	1.78		
12	2.51 (2H) t (13.5)	12	25.01 t
13	-	13	171.02 s
14	5.83 s-	14	115.32 d
15	-		174.10 s
16	4.75 (2H) s	16	73.34 t
17	0.94 d (6.5)	17	16.81 q
18	1.27 s	18	23.20 q
19	-	19	183.76 s
20	1.05 s	20	22.54 q

2.2.3g Composto **9** (acido marrulanico)

Solido amorfo. ESI-MS m/z (modalità positiva) 363 $[M+K]^+(81)$, 347 $[M+Na]^+(100)$. Analisi elementare: calcolata per $C_{18}H_{28}O_5$ C 66.64%, H 8.70%; trovata C 66.60%, H 8.68%. 1H NMR ($CDCl_3$ 400MHz): vedi tab. 9. ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100.7 MHz): vedi tab. 9.



Composto 9 (acido marrulanico)

Tabella 9. Dati NMR relativi al composto **9**.

Composto 9: acido marrulanico			
protoni	δ_H	carboni	δ_C
1a	1.74 m	1	28.52 t
1b	1.28 m		
2a	1.71 m	2	18.14 t
2b	1.48 m		
3a	2.11 m	3	28.27 t
3b	1.44 m		
4	-	4	43.81 s
5	2.24 d (4.4)	5	44.74 d
6 α	4.74 dd (4.4, 5.6)	6	76.28 d
7a	2.14 m	7	31.48 t
7b	1.65 m		
8 β	2.05 m	8	32.18 d
9	-	9	75.51 s
10	-	10	39.69 s
11a	1.48	11	34.20 t
11b	1.33		
12a	1.77 m	12	20.23 t
12b	1.72 m		
13	2.39 t (6.4) (2H)	13	34.10 t
14	-	14	-
15	-		-
16a	-	16	177.44 s
16b	-		
17	0.92 d (6.0)	17	16.53 q
18	1.29 s	18	22.86 q
19	-	19	184.01 s
20	1.04 s	20	22.29 q

2.2.4 Materiali e metodi

Gli spettri NMR sono stati acquisiti con uno spettrometro Varian Mercury 400 VX (^1H a 400.436 MHz, ^{13}C a 100.699 MHz), software Solaris 9.1, δ (ppm), J in Hz, il solvente residuo è stato utilizzato come riferimento ($\delta = 7.27$ nel ^1H e $\delta = 77.0$ nel ^{13}C). Le attribuzioni del ^{13}C sono state effettuate mediante gli spettri DEPT.

Gli spettri di massa sono stati ottenuti con un API 2000 (Applied Biosystem) usato in modalità positiva. Il potere rotatorio è stato misurato con un polarimetro Perkin-Elmer 141. Gli spettri UV sono stati ottenuti con uno spettrofotometro UV/VIS Jasco V530. L'analisi elementare è stata effettuata con un sistema Perkin-Elmer 240. L'apparato HPLC utilizzato era costituito da una pompa TSP SpectraSeries P100, equipaggiata di un iniettore Rheodyne, un rivelatore ad indice di rifrazione R 401 Waters, una colonna a fase diretta Hypersil silica (Thermo, 250 x 4.6 mm i.d, particle size 5 μm , flusso 1.5 ml/min) ed un registratore The Recorder Company. La cromatografia su strato sottile (TLC) è stata effettuata su lastre di silica gel 60 F₂₅₄, 0.25 mm, Merck, la cromatografia è stata effettuata su una colonna preparata con Si-gel 60 Merck 7734 (300 g, , 63-200 μm disattivata con il 15% di H₂O). Tutti i solventi (analitici, deuterati e per HPLC) sono stati acquistati dalla Carlo Erba Reagenti (Milano, Italy).

2.3 Attività anti-infiammatoria dell'estratto acetonic

L'attività antiinfiammatoria dell'estratto acetonic di *M. globosum* ssp. *libanoticum* e del componente puro maggioritario marrulibanoside (25 mg) è stata valutata mediante la metodica dell'edema da carragenina nel ratto.

2.3.1 Materiali e metodi

2.3.1a Animali

Sono stati utilizzati ratti maschi Wistar del peso di 100-120 g. Gli animali, forniti dalla ditta Harlan Nossan (Chieti, Italia), sono stati stabulati in locali termoregolati (temperatura di 22 ± 1 °C, umidità del 60 ± 10 %, cicli di luce e buio di 12 ore). I roditori sono stati alimentati con una dieta standard fornita dalla ditta Mucedola Mangimi (Settimo Milanese, Italia) ed avevano libero accesso a cibo ed acqua. Tutti gli animali prima di essere utilizzati per gli esperimenti sono stati lasciati stabulare per un periodo di 6-7 giorni in gabbie di propilene.

2.3.1b Edema da carragenina

Gli animali sono stati anestetizzati con isofluorano e l'edema è stato indotto iniettando a livello dell'aponeurosi plantare di una delle zampe posteriori del ratto 0.1 ml di una sospensione di carragenina (Sigma Aldrich Co, Milan, Italy) al 1%²⁰. L'incremento del volume della zampa iniettata è stato misurato immediatamente dopo l'iniezione dell'agente flogogeno utilizzando un pletismometro. Successive letture del volume della zampa sono state eseguite ad intervalli di 1 ora per un periodo non superiore alle 6 ore. Il volume della zampa misurato dopo 1-6 ore dalla somministrazione della carragenina, è stato comparato con il volume misurato immediatamente dopo l'iniezione. La differenza tra i valori ottenuti dagli animali trattati e gli animali di controllo è stata calcolata e valutata statisticamente per tutte le sei ore. L'estratto acetonic di *M. globosum*, solubilizzato in polietilenglicole (PEG), è stato somministrato 1 ora prima dell'induzione dell'edema.

2.3.1c Dosaggio radioimmunologico delle prostaglandine

Per approfondire i meccanismi con cui l'estratto acetónico di *M. globosum* esplica la sua attività antiinfiammatoria, si è determinato il suo effetto sui livelli delle prostaglandine (PGs) e del monossido d'azoto (NO) che sono tra i principali mediatori coinvolti in un processo flogistico. Inoltre per individuare la sostanza o le sostanze responsabili dell'azione antiflogistica, si è analizzato l'effetto delle 12 frazioni ottenute dall'estratto acetónico di *M. globosum* e del marrulibanoside sui livelli delle (PGs) e dell'NO.

E' stato, quindi, valutato l'effetto dell'estratto totale, delle frazioni e del marrulibanoside sull'attività della cicloossigenasi (COX-2) e della monossido d'azoto sintasi (NOS) su macrofagi intraperitoneali di topo utilizzando la metodica di Nunoshiba e coll.²¹. La migrazione dei macrofagi a livello intraperitoneale è stata stimolata mediante iniezione intraperitoneale di 2 ml di una soluzione sterile di tioglicolato 4%. Tre giorni dopo il trattamento i topi sono stati sacrificati ed i macrofagi raccolti. Successivamente, le cellule sono state poste in piastre da 24 pozzetti ad una densità di 5×10^5 cellule/pozzetto e lasciate aderire per due ore alla piastra nelle seguenti condizioni sperimentali: temperatura di 37°C, concentrazione di CO₂ 5% e concentrazione di O₂ 95%. In alcuni esperimenti i macrofagi sono stati stimolati con LPS (1 µg/ml) e γ-interferone (10 U/ml) per indurre l'espressione della COX-2 e della iNOS. La produzione delle PGE₂ da parte della COX-2 è stata determinata misurando i livelli del prostanoide mediante dosaggio radioimmunologico. La determinazione dei nitriti è stata effettuata mediante il reattivo di Griess²². L'estratto acetónico di *M. globosum* ed il desametasone, utilizzato come farmaco di riferimento, sono stati solubilizzati in etanolo.

2.3.1d Valutazione dell'espressione della COX-2 e della iNOS mediante analisi Western Blot

Sul tessuto muscolare prelevato da zampe di ratti trattati con carragenina o carragenina+estratto acetonicco di *M. globosum*, è stata valutata l'espressione della COX-2 e della iNOS mediante analisi di Wester Blot. I tessuti muscolari, sono stati omogeneizzati mediante un omogenizzatore polytron (tre cicli di 10 s alla massima velocità) in una soluzione tamponata (contenente glicerolo 2-fosfato 0.5 M, MgCl_2 20 mM, EGTA 10 mM, DTT 100 mM, Na_3VO_4 10 mM, PMSF 100 mM, aprotinina 2 mg/ml e leupeptina 2 mM). Dopo centrifugazione a 3000 gm per 5 min e a 12000 gm per 10 min a 4°C, sul supernatante è stato determinato il contenuto proteico mediante il metodo colorimetrico di Bradford (Bradford, 1976). I campioni proteici (50 µg) sono stati caricati su gel 10% SDS-PAGE e successivamente trasferiti su delle membrane di nitrocellulosa per 2.5 h a 350 mA. Le membrane sono state trattate per 1 h a temperatura ambiente con PBS-Tween 20 (0.1%) contenente 5% di latte scremato e 0.1% di PBS. Le membrane sono state lavate con PBS-Tween 20 (0.1%) ad intervalli di 10 min per 1 h, e incubati con anticorpi policlonali anti-COX-2 o anti-iNOS (dilution 1:1500 and 1:1000 for COX-2 and iNOS, rispettivamente) per tutta la notte a 4°C. Per l'individuazione della COX-2 e della iNOS, le membrane sono state lavate con PBS-Tween 20 (0.1%) ad intervalli di 10 min per 1 h ed incubati con l'anticorpo secondario (HRP-anti-rabbit IgG, 1:2000) per 1 h a temperatura ambiente. Gli immunocomplessi sono stati visualizzati mediante il metodo della chemiluminescenza. Le bande sono state quantificate attraverso analisi densitometrica mediante GS 700 Imaging Densitometer (Biorad) ed un programma di analisi (Molecular Analyst, IBM).

2.3.1e Analisi statistica

I risultati sono espressi come media \pm e.s. (n=6). L'analisi della Varianza seguita dal Dunnet test è stata utilizzata per confrontare le medie. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

2.3.2 Risultati

L'estratto del *M. globosum*, somministrato per via orale (10-100 mg/kg) 1 ora prima dell'iniezione dell'agente flogogeno, ha mostrato una significativa ($p < 0.01$) attività antiinfiammatoria riducendo l'edema nella zampa (fig. 16). L'effetto, paragonabile a quello dell'acido acetilsalicilico (ASA, 60 mg/kg) utilizzato come farmaco di riferimento, risultava significativo a partire dalla terza ora.

Gli esperimenti effettuati sui macrofagi intraperitoneali hanno evidenziato che l'estratto di *M. globosum* (50 μ g/ml) ed il marrulibanoside (50 μ g/ml) sono in grado di ridurre la produzione di PGE_2 e di nitriti (tab.10). Allo stesso modo le 12 frazioni, riducono significativamente i livelli delle PGE_2 e dei nitriti (dati non mostrati). Il desametasone (Dex; 2 μ M), usato come farmaco di riferimento, riduce i livelli delle PGE_2 ma non dei nitriti.

2.3.2a Valutazione dell'espressione della COX-2 e della iNOS mediante analisi Western Blot

L'analisi di Western blot, sugli omogenizzati ottenuti da zampe di ratti trattati con carragenina, mostra che la somministrazione dell'agente flogogeno induce un incremento dell'espressione della COX-2 e della iNOS. Il pre-trattamento degli animali

con l'estratto di *M. globosum*, a tutte le dosi usate, non modifica l'incremento della espressione della COX-2 e della iNOS (fig. 17)²³.

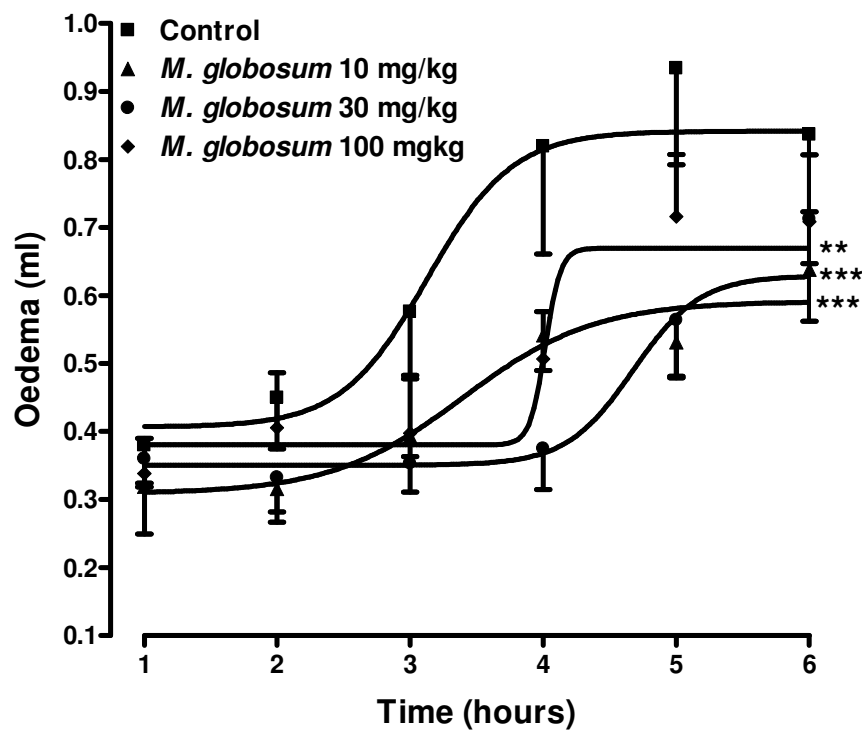


Figura 16. Effetto dell'estratto acetonicco di *Marrubium globosum* (10-100 mg/kg, os) sull'edema da carragenina nelle zampa di ratto. I dati sono espressi come media \pm S.E.M da dodici animali. ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ rispetto al gruppo di controllo (significato statistico tra due curve dose-effetto).

Tabella 10. Effetto dell'estratto di *Marrubium globosum* (50 γ /ml) e marrulibanoside (50 γ /ml) sul rilascio di PGE₂ e nitriti.

Campioni	Inibizione PGE ₂ (%)	Inibizione Nitriti (%)
<i>M. globosum</i>	42	61
Marrulibanoside	77	82
Dex (2 μ M)	94	29

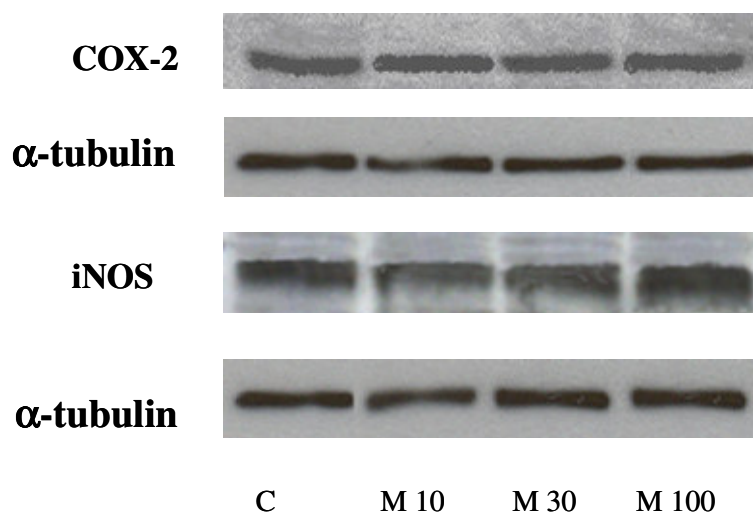


Figura 17. Espressione dell'iNOS e della COX-2 negli omogenati provenienti da zampe in cui era stato indotto l'edema da carragenina: effetto dell'estratto acetone di *Marrubium globosum* (M, 10-100 mg/kg, os). La figura è rappresentativa dei tre esperimenti.

2.4 Estrazione ed isolamento di flavonoidi e fenilpropanoidi dalle parti aeree di

Marrubium globosum ssp. libanoticum

2.4.1 Caratteristiche del campione

Vedi paragrafo 2.2.1

2.4.2 Estrazione ed isolamento

La matrice vegetale finemente polverizzata (282.3 g) è stata estratta sequenzialmente mediante macerazione a freddo con solventi a polarità crescente, prima con etere di petrolio (40-60°), poi con cloroformio ed infine con metanolo. Parte dell'estratto metanologico (31 g) è stato ripartito tra *n*-BuOH e H₂O ottenendo una frazione solubile in *n*-BuOH (13.4 g) che è stata sottoposta a cromatografia (aliquota di 2 g) ad esclusione molecolare su colonna Sephadex LH-20, usando come eluente metanolo.

Sono state così ottenute 40 frazioni di 20 ml esaminate mediante TLC utilizzando come eluente *n*-BuOH/CH₃COOH/H₂O (60:15:25 v/v) e come riferimento la rutina.

Per la rivelazione è stata utilizzata una soluzione di solfato di Cerio (IV) acida per acido solforico e le frazioni sono state riunite in base alla loro omogeneità cromatografica, ottenendo così sette riunioni: riunione **A** 1-12 (14.603 g), riunione **B** 13-17 (2.539g), riunione **C** 18-20 (0.987 g), riunione **D** 21-22 (0.522 g), riunione **E** 23-26 (0.764 g) e riunione **F** 27-40 (0.369 g).

Queste riunioni, contenenti miscele di componenti grezzi, sono state ulteriormente purificate mediante HPLC a fase inversa, con una velocità di flusso pari a 2.5 ml/min. L'eluente, CH₃OH-H₂O, è stato utilizzato secondo rapporti variabili in funzione delle

condizioni ottimali di separazione che sono state identificate con prove preliminari per ogni riunione da esaminare: riunione **B** CH₃OH-H₂O 50:50, riunione **C** CH₃OH-H₂O 60:40, riunione **D** CH₃OH-H₂O 65:35, riunione **E** CH₃OH-H₂O 70:30, riunione **F** CH₃OH-H₂O 65:35.

2.4.3 Risultati

Mediante esperimenti NMR 1D e 2D omonucleari ed eteronucleari ed alla ESI-MS utilizzata in modalità positiva e negativa e dal loro confronto con quelli riportati in letteratura è stato possibile identificare 11 composti.

Dalla riunione **B** sono stati isolati i composti puri:

- verbascoside (**1**, 50.5 mg; Rt 6 min)²⁴⁻²⁸;
- isoramnetina 3-O-β-D-rutinoside (**2**, 23.2 mg; Rt 12.5 min)²⁷;
- quercetina 3-O-β-D-rutinoside (**3**, 29.2 mg; Rt 10 min)^{27,29};
- naringenina 7-O-β-D-glucoside (**4**, 5.1 mg; Rt 5.2 min)³⁰;
- kaempferolo 3-O-β-D-rutinoside (**5**, 25.9 mg; 12 min)²⁷.

Dalla riunione **C** sono stati isolati i composti puri:

- isoramnetina 3-O-β-D-glucoside (**6**, 17.1 mg; Rt 6 min)²⁷;
- quercetina 3-O-β-D-glucoside (**7**, 2.5 mg; Rt 5 min)^{27,29}.

Dalla riunione **D** è stato isolato il composto puro:

- apigenina 7-O-(3''-*p*-cumaril)-glucoside (**8**, 47.8 mg; Rt 11 min)^{27,28}.

Dalla riunione **E** sono stati isolati i composti puri:

- acido *p*-metossi cinnamico (**9**, 44.6 mg; Rt 8 min)²⁸;
- kaempferolo 3-O-β-glucoside (**10**, 9.2 mg; Rt 8.4 min)^{26,27}.

Dalla riunione **F** è stato isolato il composto puro:

- apigenina 7-O- β -D-glucoside (**11**, 28.3 mg; Rt 6.2 min)³¹.

Come evidenziato in precedenza, tra i composti fenolici piu' rappresentativi del genere *Marrubium* i flavonoidi e i fenilpropanoidi sono le classi principali. Altri studi hanno indicato che la maggior parte dei flavonoidi presenti nella famiglia delle Lamiaceae sono flavoni, al contrario i flavonoli si ritrovano solo in pochi generi³¹. E' stata dimostrata, infatti, una completa dominanza di flavoni e la presenza di pochi flavonoli: in particolare il kampferolo precedentemente isolato da *M. peregrinum*²⁶ e *M. velutinum*²⁷, l'isoramnetina da *M. velutinum*²⁷, la quercetina da *M. vulgare*²⁹ e da *M. velutinum*²⁷.

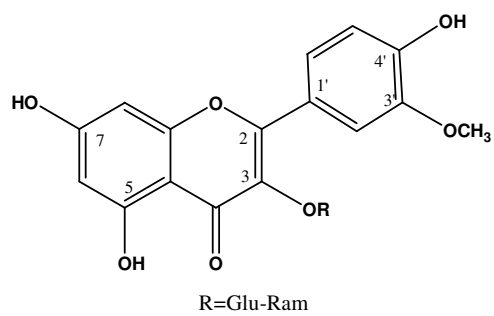
Si è potuto constatare che, contrariamente a ciò che accade nelle altre specie, nel *M. globosum* ssp. *libanoticum* si trovano sei flavonoli quali: la quercetina 3-O- β -rutinoside, la quercetina 3-O- β -glucoside, il kampferolo 3-O- β -rutinoside, il kampferolo 3-O- β -glucoside, l'isoramnetina 3-O- β -rutinoside, l'isoramnetina 3-O- β -glucoside, mentre i flavoni contenuti sono solo due: l'apigenina 7-O- β -glucoside e l'apigenina 7-O- β -(3''-*p*-cumaril)-glucoside

Come si può notare questi flavonoidi sono presenti esclusivamente in forma glicosilata, ciò rappresenta una caratteristica che contraddistingue questa specie poiché generalmente tali composti sono presenti sia come glicosidi che come agliconi liberi nel genere *Marrubium*. Inoltre è stata rilevata la presenza di un flavanone derivato, la naringerina 7-O- β -D-glucoside, la quale non è mai stata isolata precedentemente in questo genere³².

Per quanto riguarda il verbascoside, esso è stato individuato anche in altre specie come *M. vulgare*²⁴, *M. alysson*²⁵, *M. peregrinum*²⁶ e *M. velutinum*^{27,28}.

2.4.3a Flavonoidi

Struttura chimica dell'*isoramnetina- 3-O-β-D-rutinoside*

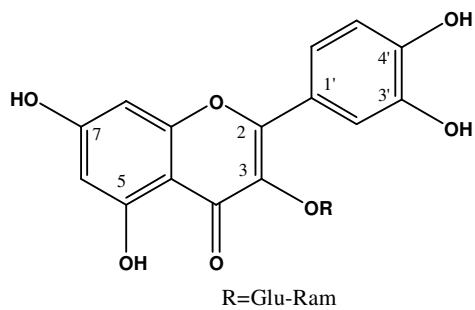


(2)

Tabella 11. dati ^1H e ^{13}C NMR relativi al composto **2**

C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2	-	158.3
3	-	135.4
4	-	179.2
5	-	158.8
6	6.25 d (1.7)	99.9
7	-	165.9
8	6.49 d (1.9)	94.9
9	-	162.8
10	-	105.6
1'	-	122.9
2'	7.98 d (1.8)	114.5
3'	-	148.2
4'	-	150.7
5'	6.94 d (8.5)	116.0
6'	7.65 dd (1.9; 7.6)	123.9
1''(Glu)	5.27 d (7.5)	104.4
1'''(Rha)	4.57 d (1.5)	102.4

Struttura chimica della *quercetina-3-O-β-D-rutinoside*

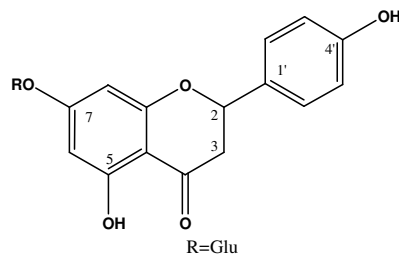


(3)

Tabella 12. dati ^1H e ^{13}C NMR relativi al composto 3

C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2	-	148.7
3	-	137.0
4	-	177.5
5	-	163.2
6	6.21 d (1.7)	99.7
7	-	162.3
8	6.40 d (1.9)	95.4
9	-	157.7
10	-	106.1
1'	-	123.0
2'	7.68 d (1.8)	112.6
3'	-	150.2
4'	-	148.8
5'	6.88 d (8.5)	116.3
6'	7.65 dd (1.9; 7.6)	123.0
1''(Glu)	5.10 d (7.5)	102.5
1'''(Rha)	4.53 d (1.5)	100.0

Struttura chimica della *naringenina-7-O- β -D-glucoside*

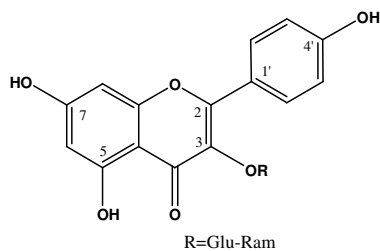


(4)

Tabella 13. dati ^1H e ^{13}C NMR relativi al composto al **4**

C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2	5.39 dd (2.9; 12.8)	78.8
3a	3.21 dd (12.8; 17.1)	43.6
3b	2.77 dd (2.9; 17.1)	
4	-	195.5
5	-	163.7
6	6.22 s	95.3
7	-	165.0
8	6.29 s	93.4
9	-	102.1
10	-	163.1
1'	-	129.1
2'	7.34 d (8.5)	128.3
3'	6.81 d (8.5)	115.6
4'	-	160.2
5'	6.81 d (8.5)	115.7
6'	7.34 d (8.5)	128.5
1''	4.98 d (7.5)	100.2

Struttura chimica della *kaempferolo-3-O-β-D-rutinoside*

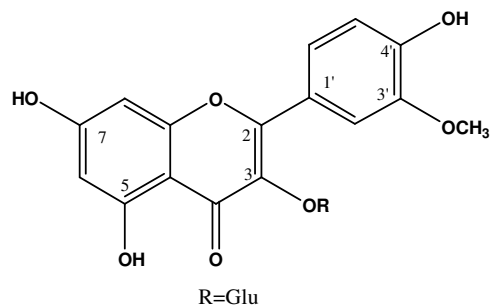


(5)

Tabella 14: dati ^1H e ^{13}C NMR relativi al composto **5**

C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2	-	158.7
3	-	134.0
4	-	180.9
5	-	162.8
6	6.21 d (2)	99.4
7	-	165.6
8	6.40 d (2)	99.8
9	-	158.7
10	-	105.0
1'	-	123.1
2'	8.06 d (8.9)	129.4
3'	6.89 d (8.9)	117.1
4'	-	162.1
5'	6.89 d (8.9)	117.1
6'	8.06 d (8.9)	129.4
1''(Glu)	5.12 d (7.0)	105.3
1'''(Rha)	4.52 d (1.5)	103.0

Struttura chimica dell'*isoramnetina-3-O-β-D-glucoside*

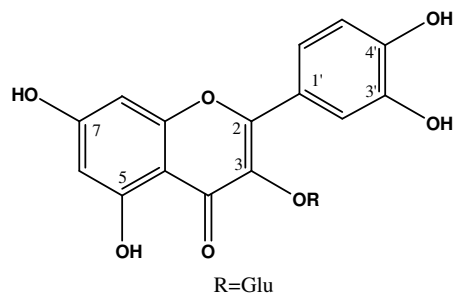


(6)

Tabella 15. dati ^1H e ^{13}C NMR relativi al composto **6**

C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2	-	158.3
3	-	135.4
4	-	179.2
5	-	158.8
6	6.25 d (1.7)	99.9
7	-	165.9
8	6.49 d (1.9)	94.9
9	-	162.8
10	-	105.6
1'	-	122.9
2'	7.91 d (1.8)	114.5
3'	-	148.2
4'	-	150.7
5'	6.88 d (8.5)	116.0
6'	8.03 dd (1.9; 7.6)	123.9
1''(Glu)	5.27 d (7.5)	104.4

Struttura chimica della *quercetina-3-O-β-D-glucoside*

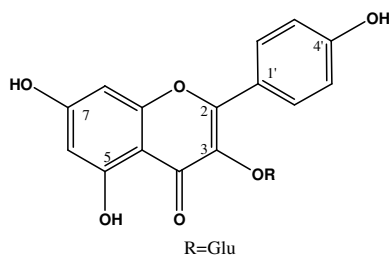


(7)

Tabella 16. dati ^1H e ^{13}C NMR relativi al composto **7**

C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2	-	148.7
3	-	137.0
4	-	177.5
5	-	163.2
6	6.19 d (1.7)	99.7
7	-	162.3
8	6.38 d (1.9)	95.4
9	-	157.7
10	-	106.1
1'	-	123.0
2'	7.70 d (1.8)	112.6
3'	-	150.2
4'	-	148.8
5'	6.86 d (8.5)	116.3
6'	7.59 dd (1.9; 7.6)	123.0
1''(Glu)	5.23 d (7.5)	102.5

Struttura chimica del *kaempferol-3-O-β-glucoside*

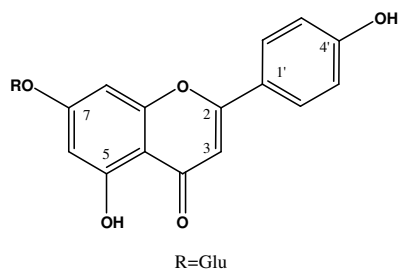


(10)

Tabella 17. dati ^1H e ^{13}C NMR relativi al composto 10

C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2	-	158.7
3	-	134.0
4	-	180.9
5	-	162.8
6	6.25 d (2)	99.4
7	-	165.6
8	6.49 d (2)	99.8
9	-	158.7
10	-	105.0
1'	-	123.1
2'	7.88 d (8.9)	129.4
3'	6.88 d (8.9)	117.1
4'	-	162.1
5'	6.88 d (8.9)	117.1
6'	7.88 d (8.9)	129.4
1''(Glu)	5.07 d (7.2)	105.3

Struttura chimica dell'*apigenina-7-O-β-D-glucoside*



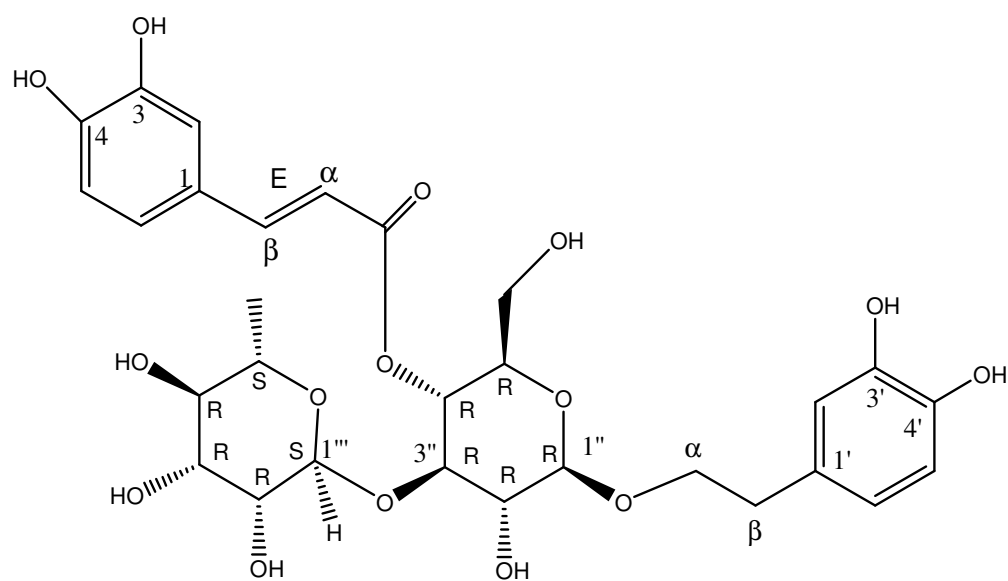
(11)

Tabella 18. dati ^1H e ^{13}C NMR relativi al composto **11**

C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2	-	164.5
3	6.48 s	103.5
4	-	181.8
5	-	161.1
6	6.62 d (2)	99.7
7	-	163.1
8	6.79 d (2)	95.0
9	-	157.0
10	-	105.6
1'	-	121.7
2'	7.85 d (8.9)	113.9
3'	6.88 d (8.9)	145.8
4'	-	149.8
5'	6.88 d (8.9)	116.2
6'	7.85 d (8.9)	119.3
1''(Glu)	5.07 d (7.2)	100.3

2.4.3b Fenilpropanoidi

Struttura chimica del *verbascoside*

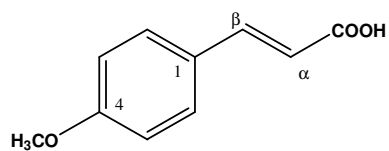


(1)

Tabella 19. dati ^1H e ^{13}C NMR relativi al composto 1

	C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
acido caffeico	CO	-	167.9
	α	6.26 d (15.9)	115.3
	β	7.54 d (15.9)	147.6
	1	-	127.4
	2	7.10 d (1.9)	111.5
	3	-	149.4
	4	-	146.4
	5	6.71 d (8.1)	116.1
	6	6.98 dd (8.6, 8.2) dd (17, 17.6)	122.9
Aglicone	α	4.04 dd (17, 17.6)-3.71, dd (17, 17.6)	72.0
	β	2.70 t (7.6,7.3)	36.3
	1'	-	131.2
	2'	6.70 d (8.0)	116.8
	3'	-	144.4
	4'	-	145.9
	5'	6.59 d (8.0)	116.2
	6'	6.46 dd (8.0-1.9)	116.8
β-D-glucosio	1	4.28 d (8.2)	103.9
	2	3.43 dd (8.6, 8.2)	75.8
	3	3.86 t	81.4
	4	4.99 dd (9.5, 9.4)	70.1
	5	3.53 m	69.9
	6	3.56 dd (13.8, 9.8)-3.66 dd (13.8,9.8)	61.8
β-D-ramnosio	1'	5.23 d (1.6)	102.9
	2'	3.98 dd (3.2, 1.8)	71.8
	3'	3.63 dd (3.3, 3.2)	73.6
	4'	3.53 dd (9.6, 3.3)	73.3
	5'	3.56 dd (9.6)	75.4
	6'	⁸¹ 1.12 d (6.2)	18.1

Struttura chimica dell'*acido p-metossi cinnamico*

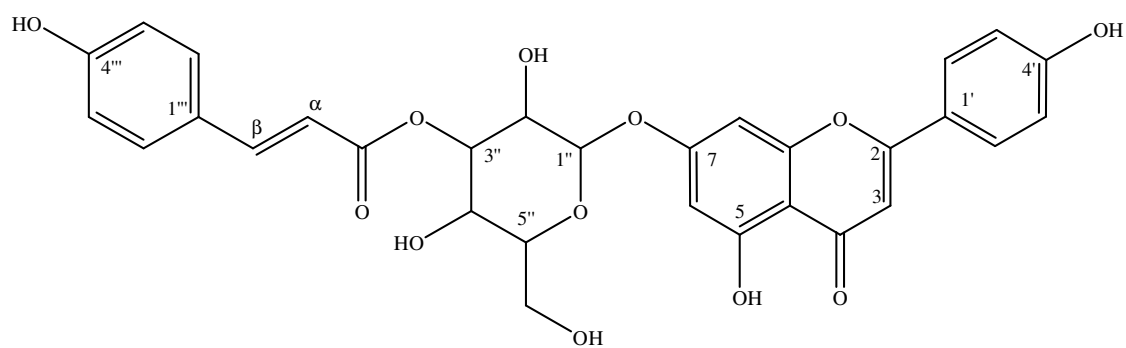


(9)

Tabella 20. dati ^1H e ^{13}C NMR relativi al composto

C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	-	125.0
2	7.45 d (8.5)	130.2
3	6.80 d (8.5)	114.5
4	-	148.0
5	6.80 d (8.5)	114.5
6	7.45 d (8.5)	130.2
α	6.30 d (15.9)	111.2
β	7.6 d (15.9)	144.7
OCH3	3.77 s	56
CO	-	166.8

Struttura chimica dell'*apigenina-7-O-(3''-p-cumaril)-glucoside*



(8)

Tabella 21. dati ^1H e ^{13}C NMR relativi al composto 8

	C	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
apigenina	2	6.74 s-	156.8
	3		103.3
	4		180.0
	5	-	161.3
	6	6.48 d (2.5)	99.4
	7	-	162.5
	8	6.72 d (2.5)	95.0
	9		157.0
	10		106.5
	1'		123.0
	2'	7.82 d (8)	128.5
	3'	6.84 d (8)	116.0
	4'		161.2
	5'	6.84 d (8)	115.9
	6'	7.82 d (8)	128.5
β -D-glucosio	1''	5.11 d (8)	99.8
	2''	3.50 br t (8.5)	73.2
	3''	5.08 dd (9;9.5)	76.5
	4''	3.55 dd (9.5;10)	69.5
	5''	3.8 m	74.6
	6''	4.2 dd (6.5;11.5)-4.5 d (11.5)	63.1
<i>p</i> -cumaril	CO		167.9
	α	6.35 d (16)	115.6
	β	7.58 d (16)	147.9
	1'''		128.0
	2'''	7.41 d (8)	130.5
	3'''	6.88 d (8)	115.9
	4'''		149.0
	5'''	6.88 d (8)	115.9
	6'''	7.41 d (8)	130.5

2.4.4 Materiale e metodi

Gli spettri NMR sono stati acquisiti con uno spettrometro Varian Mercury 400 VX (^1H a 400.436 MHz, ^{13}C a 100.699 MHz), software Solaris 9.1 δ (ppm), J in Hz, il solvente residuo è stato utilizzato come riferimento ($\delta = 3.34$ nel ^1H e $\delta = 49.0$ nel ^{13}C). Gli spettri di massa sono stati ottenuti con un API 2000 (Applied Biosystem) usato in modalità positiva e negativa. Gli spettri UV sono stati ottenuti con uno spettrofotometro UV/VIS Jasco V530. L'apparato HPLC utilizzato era costituito da una pompa Waters 590, equipaggiata di un iniettore Rheodyne, un rivelatore ad indice di rifrazione R 401 Waters, una colonna a fase inversa su colonna C_{18} μ -BondapakTM (30 cm, 7.8 mm i.d., particle size 10 μm , flusso 2.5 ml/min) ed un registratore The Recorder Company. La cromatografia su strato sottile (TLC) è stata effettuata su lastre di silica gel 60 F₂₅₄, 0.25 mm, Merck, la cromatografia ad esclusione molecolare è stata effettuata su una colonna impaccata con Sephadex LH-20 (Pharmacia). Tutti i solventi ed i riferimenti (analitici, deuterati e per HPLC) sono stati acquistati dalla Carlo Erba Reagenti (Milano, Italy).

2.5 Isolamento e caratterizzazione degli oli essenziali di *M. globosum* ssp. *libanoticum* e *M. cuneatum*

2.5.1 Caratteristiche dei campioni

Per le parti aeree di *M. globosum* Montbr. et Auch. ex Benth. ssp. *libanoticum* (Boiss) Davis vedi paragrafo 2.2.1.

Le parti aeree di *M. cuneatum* Banks et Solander sono state raccolte il 15 Maggio 2003 nei pressi di Rachaya Al Uadi in Libano a 810 sul livello del mare. Un campione è depositato nell'“Herbarium Neapolitanum” (NAP # 24), Dipartimento di Biologia Vegetale, Università degli Studi di Napoli “Federico II”.

2.5.2 Isolamento degli oli

Campioni di matrice di 10 g sono stati sottoposti ad idrodistillazione per 3 h come descritto dalla Farmacopea Europea³³ usando *n*-esano come solvente. Dall'idrodistillazione si è ottenuta una resa di olio, dello 0.13% per il *M. globosum* e dello 0.19% per il *M. cuneatum*; il colore degli oli tende al giallo paglierino ed emana un odore peculiare.

Gli oli ottenuti sono stati anidrificati con Na₂SO₄ e conservati a -20°C, sotto azoto, in vials sigillate, fino al momento dell'analisi.

2.5.3 Analisi degli oli

L'analisi e l'identificazione è avvenuta mediante GC e GC/MS.

Le analisi GC sono state effettuate con un gascromatografo Perkin-Elmer Sigma-115 dotato di un FID e del relativo computer. La separazione è stata realizzata con una colonna HP-5 di gel di silice fusa (30 m x 0.25 mm i.d., film 0.25 μ m).

Si è proceduto con le seguenti condizioni operative: le temperature dell'iniettore e del detector sono state fissate, rispettivamente, a 250°C e 290°C; la temperatura, del forno è stata mantenuta per 5 min. a 40°C, poi è stata portata, aumentandola di 2°C/min, a 260°C e mantenuta a 260°C per 20 min, utilizzando He come carrier gas (1ml/min); la modalità di iniezione era splitless (1 μ l di una soluzione 1:1000 *n*-esano). Gli indici di ritenzione (R_i) sono stati determinati in relazione alle serie omologhe degli *n*-alcani (C₈-C₂₄) alle medesime condizioni. Le concentrazioni relative dei componenti sono state ottenute mediante la normalizzazione dell'area dei picchi

Le analisi GC/MS sono state effettuate con un gascromatografo Hewlett-Packard 5890 A, collegato con un HP Mass Selective Detector MSD 5970 HP in condizioni di GC analoghe a quelle già riportate. E' stata utilizzata una colonna di gel di silice fusa HP-5 (30 m x 0.25 mm i.d.; film 0.33 μ m). Sono state utilizzate le stesse temperature dell'analisi GC. La transfer line è stata mantenuta a 290°C. Temperatura dell'interfaccia 295°C. Gli spettri MS sono stati ottenuti impostando un range di massa 29-350 *m/z* un EI con voltaggio di ionizzazione di 70 eV, electron multiplier energy 2000V ed un tempo di scansione di un 1s; come carrier gas è stato utilizzato He ad un flusso di 1.0 ml/min.

I costituenti dell'olio sono stati identificati dai loro indici di ritenzione^{34,35}, per confronto dei loro spettri di massa con quelli riportati in letteratura^{36,37} e per confronto dei loro spettri di massa con quelli registrati nelle librerie in dotazione al computer della

GC/MS (NIST98 e WILEY-5); inoltre, quando possibile, è stata effettuata la coiniezione con standards disponibili in laboratorio.

2.5.4 Valutazione dell'attività antimicrobica

L'attività antibatterica è stata testata mediante il metodo della diffusione in agar con dischetti di carta³⁸ su otto ceppi batterici tra i più rappresentativi dei Gram + e dei Gram -.

Gli oli sono stati testati puri (*Marrubium globosum* 10µL; 8,9µg e *Marrubium cuneatum* 10µL; 8,7µg) e diluiti con *n*-esano. I dischetti di carta sterili di 6 mm (Whatman No.1) sono stati impregnati con 10 µl di ogni soluzione e collocati sulla superficie dell'agar così preparato: 9 ml di Agar Mueller-Hintoned ed 1 µl di inoculo standardizzato del microrganismo. Le piastre di agar sono state esaminate dopo 24 ore di incubazione a 37° per valutare gli aloni di inibizione. Per ogni campione sono stati allestiti tre saggi.

I dischetti di controllo contenenti 10 µl di *n*-esano non hanno mostrato inibizione della crescita batterica; come controlli positivi sono stati adoperati Gentamicina (10 µg) e Lincomicina (15 µg) rispettivamente per i Gram – ed i Gram + .

Per testare l'attività antibatterica degli oli sono stati impiegati i seguenti microrganismi: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (PCI 213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhi* Ty2 (ATCC 19430).

2.5.5 Risultati

La composizione delle frazioni volatili di *M. globosum* ssp. *libanoticum* e di *M. cuneatum* è mostrata in tabella 22 secondo il loro R_i su una colonna DB-5.

Entrambi gli oli mostravano un colore giallo chiaro e presentavano un odore caratteristico.

Nell'olio di *M. globosum* ssp. *libanoticum* (resa 0.13%) sono stati identificati 53 componenti che rappresentavano il 93.4% del totale mentre nel *M. cuneatum* (resa 0.19%) 46 componenti che rappresentavano il 91.4% del totale. Nella composizione chimica si notavano alcune somiglianze tra i due campioni di olio che contenevano circa la stessa quantità di composti sesquiterpenici presenti però in una composizione abbastanza differente. Il β -cariofillene (12.4%), l'(E)- β -farnesene (5.8%), lo spatulenolo (5.2%) ed il cariofillene ossido (4.5%) erano i principali componenti della frazione sesquiterpenoidica dell'olio di *M. globosum* ssp. *libanoticum*, mentre i principali componenti di questa frazione nell'olio di *M. cuneatum* erano il germacrene D (15.6%), lo spatulenolo (6.5%) ed il cariofillene ossido (6.2%).

Nel *M. cuneatum* è stata anche rilevata una notevole quantità di β -cariofillene (5.2%) e biciclogermacrene (5.2%). I contenuti di composti carbonilici, acidi grassi e dei loro derivati esterei era abbastanza simile. Il *p*-metossiacetofenone e l'esaidrofarnesil acetone erano i principali componenti della frazione carbossilica, comprese tra il 3.5% ed il 5.4% nel *M. globosum* ssp. *libanoticum* e tra il 4% ed il 2.7% nel *M. cuneatum*. Anche l'acido esadecanoico riscontrato nel *M. parviflorum* Fish et Mey. ssp. *oligodon* (Boiss) Seybold³⁹ come principale componente dell'olio (15.4%), era presente nei nostri campioni circa alla stessa concentrazione, 7.4% e 6.5% rispettivamente per il *M. globosum* ssp. *libanoticum* ed il *M. cuneatum*. Il carvacrolo

(5.0% e 2.3%) era presente in entrambi gli oli mentre l'eugenolo solo nel *M. globosum*. Inoltre, i componenti a 13 atomi di carbonio (3.5%) sono stati individuati solo nell'olio di *M. globosum*. In un precedente studio condotto sull'olio di *M. cuneatum*⁴⁰ erano stati identificati 23 composti che rappresentavano l'89.1% dell'olio estratto da parti aeree di una pianta raccolta in Iran. I principali componenti di quest'olio risultavano essere: il biciclogermacrene (37.9%), il germacrene D (24.1%) e lo spatulenolo (4.8%).

La differente composizione degli oli studiati può spiegare la diversa attività biologica da essi mostrata (tab. 23). Infatti l'attività antibatterica degli oli, testata mediante il metodo *in vitro* della diffusione in agar con dischetti di carta e riportata nella tabella 23., mostra che il campione di olio ottenuto da *M. globosum* ssp. *libanoticum* possiede una certa attività verso i Gram positivi, un'attività poco significativa nei confronti di *Escherichia coli* e *Salmonella typhi* Ty2 e nessuna attività verso gli altri ceppi Gram negativi saggiati. Il campione di olio estratto da *M. cuneatum* evidenzia una bassa attività (diametro di inibizione di 8-10 mm) antibatterica verso i Gram positivi, una non apprezzabile attività nei confronti di *Escherichia coli* (diametro di inibizione di 8mm del campione usato puro) e nessuna attività verso gli altri ceppi Gram negativi saggiati .

La maggiore attività dell'olio essenziale del *M. globosum* ssp. *libanoticum* può essere spiegata dal fatto che quest'olio contiene una buona quantità di cariofillene ed altri componenti come il linalolo, l' α -terpineolo, l'eugenolo che, anche se presenti in basse quantità, possono incrementare l'azione del carvacrolo mediante un effetto sinergico.

Tabella 22. Composizione chimica degli oli essenziali estratti dalle parti aeree di *M. globosum* Montbr. et Auch. ex Benth. ssp. *libanoticum* (Boiss) Davis e *M. cuneatum* Banks et Solander.

K_i	Component	Identification^a	M. g.^b	M. c.^b
936	α -Pinene	R _i , MS, Co-GC	0.5	0.9
992	Mircene	R _i , MS		0.2
1032	Limonene	R _i , MS, Co-GC		0.5
1045	Fenil acetaldeide	R _i , MS, Co-GC	0.8	1.0
1101	Linalolo	R _i , MS, Co-GC	0.5	1.6
1102	Nonanale	R _i , MS, Co-GC	0.3	0.2
1180	Naftalene	R _i , MS, Co-GC	1.4	0.9
1190	α -Terpineolo	R _i , MS, Co-GC	0.4	
1203	Decanale	R _i , MS, Co-GC	0.2	
1296	Carvacrolo	R _i , MS, Co-GC	5.0	2.3
1302	<i>p</i>-Methossiacetofenone	R _i , MS	3.5	5.4
1353	α -Cubebene	R _i , MS	0.4	0.4
1355	Eugenolo	R _i , MS, Co-GC	0.8	
1371	α -Copaene	R _i , MS	0.2	0.1
1381	(Z)- β -Damascenone	R _i , MS	0.6	
1386	β -Bourbonene	R _i , MS		T
1389	β -Elemene	R _i , MS		0.2
1390	(E)- β -Damascone	R _i , MS	0.2	T
1403	Dodecanale	R _i , MS, Co-GC	0.2	
1412	Nerilacetone	R _i , MS	0.9	
1412	α -Cedrene	R _i , MS, Co-GC	0.3	
1414	β -Cariofillene	R _i , MS, Co-GC	12.4	5.2
1433	β -Gurjunene	R _i , MS		0.1

1439	Aromadendrene	R _i , MS		0.5
1440	<i>trans</i> - α -Bergamotene	R _i , MS	0.9	T
1450	Geranil acetone	R _i , MS	0.7	
1453	α -Humulene	R _i , MS	2.1	0.4
1454	(E)-β-Farnesene	R _i , MS	5.8	1.0
1462	<i>allo</i> -Aromadendrene	R _i , MS	0.9	
1488	Germacrene D	R _i , MS	0.3	15.6
1485	(E)- β -Ionone	R _i , MS	1.1	
1494	Biciclogermacrene	R _i , MS		5.2
1498	α -Zingiberene	R _i , MS	0.7	
1510	β -Bisabolene	R _i , MS	1.0	3.1
1518	δ -Cadinene	R _i , MS	0.5	0.2
1572	Spatulenolo	R _i , MS	5.2	6.5
1575	Germacrene D-4-olo	R _i , MS		1.3
1577	Cariofillene ossido	R _i , MS, Co-GC	4.5	6.2
1584	Globulolo	R _i , MS	1.6	1.3
1597	Sesquilavandulolo	R _i , MS	0.9	T
1598	Acido dodecanoico	R _i , MS, Co-GC	0.7	
1671	β -Bisabololo	R _i , MS	1.6	
1678	Tetradecanolo	R _i , MS, Co-GC	0.3	
1685	α -Bisabololo	R _i , MS	0.6	
1715	(E)-Nerolidil acetato	R _i , MS	0.8	
1771	Acid tetradecanoico	R _i , MS, Co-GC	2.0	
1846	Esaidrofarnesil acetone	R _i , MS	4.0	2.7
1927	Acido esadecanoico metil estere	R _i , MS, Co-GC	0.8	3.2
1950	Fitolo	R _i , MS	2.9	3.2

1967	Acido esadecanoico	R _i , MS, Co-GC	7.4	6.5
2083	Acido 9,12-octadecadienoico metil estere	R _i , MS, Co-GC		2.0
2140	Acido 9,12,15-octadecatrienoico metil estere	R _i , MS, Co-GC	3.2	1.1
2154	Acido (Z)-9-octadecenoico	R _i , MS, Co-GC	2.3	4.2
2300	Tricosano	R _i , MS, Co-GC	2.0	1.4
2400	Tetracosano	R _i , MS, Co-GC	0.6	0.4
2500	Pentacosano	R _i , MS	2.2	1.6
2600	Esacosano	R _i , MS	0.2	0.5
2700	Eptacosano	R _i , MS	3.0	2.3
2800	Octacosano	R _i , MS	0.3	0.6
2900	Nonacosano	R _i , MS	1.2	0.8
3000	Triacantano	R _i , MS	0.9	
3100	Entriacantano	R _i , MS	1.0	0.4
3200	Dotriacantano	R _i , MS		0.2
3300	Tritriacantano	R _i , MS	1.1	
	Totale		93.4	91.4

K_i: Indice di ritenzione su colonna DB-5; **M.g.** = *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*; **M.c.** = *Marrubium cuneatum*.

a: R_i = Indice di ritenzione identico alla bibliografia; MS = Identificazione basata su confronto di spettri di massa; Co-GC = Tempo di ritenzione identico a quello di composti autentici;

b: T = presente in tracce, meno dello 0.05 %.

Tabella 23. Attività antibatterica dell'olio essenziale di *M. globosum* e *M. cuneatum*

Batteri	<i>M. globosum</i> (1)			<i>M. cuneatum</i> (2)			Gent.	Linc.
	puro	1:5	1:10	puro	1:5	1:10		
<i>Bacillus cereus</i>	12	9	-	10	7	-	nt	22
<i>Bacillus subtilis</i>	11	8	-	9	-	-	nt	21
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	9	-	10	8	-	nt	25
<i>Streptococcus faecalis</i>	10	-	-	9	-	-	nt	16
<i>Escherichia coli</i>	10	7	-	8	-	-	18	nt
<i>Proteus mirabilis</i>	7	-	-	-	-	-	20	nt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	21	nt
<i>Salmonella typhi</i> Ty2	8	-	-	-	-	-	22	nt

I valori rappresentano il diametro della zona di inibizione (mm) compreso il diametro del dischetto.

Gent = Gentamicina; Linc = Lincomicina; nt = non testato; - = non attivo.

CAPITOLO III

Altre Lamiaceae studiate

3.1 Altre Lamiaceae

3.1.1 *Mentha piperita*

3.1.1a Descrizione e generalità

E' una pianta alta 0.3-0.9 m, molto aromatica, presenta foglie allungate-ovate, appuntite, chiaramente peduncolate, dentate, con margine piano e fiori in lunghe infiorescenze a forma di spiga, a capolino nei rami laterali (fig. 18). Questa specie deriva dall'incrocio tra la *Mentha aquatica* e la *Mentha spicata* coltivata già nell'antichità ed occasionalmente inselvaticata.

3.1.1b Proprietà

E' utilizzata nella medicina popolare ed in numerosi preparati medicinali per il trattamento di disturbi dell'area gastrointestinale, del fegato e della cistifellea. Possiede proprietà antispastiche, bechiche, antifermentative, colagoghe e coleretiche. E' usata anche come correttivo del sapore e dell'odore.



Figura 18. *Mentha piperita* L.

3.1.2 *Ocimum basilicum*

3.1.2a Descrizione e generalità

Pianta di 0.2-0.4 m di altezza, glabra, profumata dal fusto eretto e ramoso. Presenta foglie intere con picciuolo di 5-15 mm e lamina lanceolata a ovale, margine da intero a seghettato.

Le infiorescenze sono costituite da verticillastri di 4-6 fiori all'ascella di foglie ridotte, le superiori spesso sono arrossate, la corolla è bianca o più o meno rosea, sono presenti 4 stami, giacenti sul labro inferiore e sporgenti oltre questo (fig. 19).

Originario dell'India, dove dalla religione Indu è considerato una pianta sacra, è coltivato nelle terre del Mediterraneo da migliaia di anni. Oltre a questa specie, altre vengono coltivate e tra queste la specie *Ocimum minimum*, il basilico greco, che è una pianta nana di appena 15 cm di altezza.

3.1.2b Proprietà

E' utilizzata in campo alimentare per la sua capacità di stimolare la digestione e l'appetito, agisce contro la flatulenza e favorisce la secrezione latte. Viene utilizzata per disturbi gastrointestinali e delle vie urinarie, leucorrea e catarri della mucosa. E' utilizzato anche come repellente per insetti.



Figura 19. *Ocimum basilicum* L.

3.1.3 *Rosmarinus officinalis*

3.1.3a Descrizione e generalità

Si presenta come cespuglio alto 0.5-1 m con rami prostrati o ascendenti, raramente eretti e corteccia bruno-chiara. Le foglie sono lineari revolute sul bordo, verde-scuro e lucide sopra, bianco tomentose nella pagina inferiore; le infiorescenze sono in genere in racemi ascellari da 4-16 fiori dal calice pubescente bilabiato da 5-6 mm presentano una corolla azzurro-chiara o lilla, raramente rosea o bianca (fig. 20).

Costituisce un elemento caratteristico della macchia bassa e gariga mediterranea, già dall'antichità è comunemente impiegato come pianta medicinale.

3.1.3b Proprietà

Viene utilizzata in campo alimentare; ma anche nella cura di nevralgie, disturbi dell'irrorazione sanguigna, in balsami bronchiali; inoltre è molto usato nella preparazione di formulazioni antiforfora.



Figura 20. *Rosmarinus officinalis* L.

3.1.4 *Salvia officinalis*

3.1.4a Descrizione e generalità

E' un semiarbusto alto 0.2-0.7 m aromatico, legnoso alla base e grigio-tomentoso. Presenta foglie ispessite, rugose, peduncolate, allungato-ovate dotate di un picciuolo di 10-15 mm. I fiori con corolla lunga 2-3 cm, il più delle volte blu-violetta, si presentano da 5 a 10 verticilli in morbide infiorescenze a forma di spiga (fig. 21). Molto diffusa ed originaria del mediterraneo, celebre e largamente coltivata già nell'antichità; il nome ha la medesima etimologia di "salvare" e da esso deriva il tedesco Salbe (unguento medicamentoso). Molto citato il detto della Scuola Salernitana: "*Cur moriatur homo, cui Salvia crescit in horto?*".

3.1.4b Proprietà

Per uso interno come antidrotico, è in grado di inibire la secrezione lattea; è utilizzata come antiinfiammatorio nelle infezioni dell'apparato respiratorio, talvolta del canale gastrointestinale. L'uso in dosi elevate e per tempi prolungati può causare avvelenamento.

3.1.5 *Thymus pulegioides*

3.1.5a Descrizione e generalità

E' una pianta aromatica alta da 0.05 a 0.3 m, legnosa alla base, con fusti da prostrati ad eretti; le foglie sono piccole peduncolate, ovate, cigliate solo alla base. I germogli in fiore quadrangolari, sono pubescenti sui lati, e si presentano in infiorescenze a capolino allungato (fig. 22). Questa specie è spesso confusa con altre come il *Thymus serpyllum* che invece è più rara. Il suo habitat ideale è costituito dai pascoli e dai prati asciutti di Europa ed Asia.

3.1.5b Proprietà

E' utilizzato come calmante della tosse e nei disturbi gastrointestinali.



Figura 22. *Thymus pulegioides* L.

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Caratteristiche dei campioni

Le parti aeree delle piante sono state raccolte nei pressi di Agerola (Monti Lattari, provincia di Napoli, 750 m sul livello del mare) nel luglio 2001.

3.2.2 Isolamento dell'olio essenziale

Campioni di 20 g delle parti aeree sono stati raccolti, essiccati, finemente polverizzati e sottoposti ad idrodistillazione per 3 h come descritto dalla Farmacopea Europea (1997). Le rese sono state le seguenti: 0.21% sul peso fresco per *Ocimum basilicum*, 0.32% su peso fresco per *Mentha piperita*, 0.85% su peso secco per *Rosmarinus officinalis*, 0.95% su peso secco per *Salvia officinalis*, 0.78% su peso fresco per *Thymus pulegioides*. Gli oli ottenuti sono stati anidrificati con solfato di sodio anidro e conservati sotto azoto a -20°C in vials sigillate, fino al momento dell'analisi.

3.2.3 Analisi degli oli

L'analisi e l'identificazione degli oli sono state effettuate mediante GC e GC/MS utilizzando lo stesso strumento e le medesime condizioni operative dell'analisi degli oli di *Marrubium globosum* e *Marrubium cuneatum* (paragrafo 2.5.3).

3.2.4 Valutazione dell'attività antibatterica

L'attività antibatterica degli oli essenziali è stata valutata determinando la concentrazione minima inibente (MIC) e la concentrazione minima battericida (MBC), usando il metodo della diluizione in brodo. Sono state utilizzate otto specie batteriche, selezionate come rappresentative della classe dei Gram positivi e dei Gram negativi: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhi* ty2 (ATCC 19430).

I ceppi sono stati coltivati su agar Tryptone Soya (Oxoid, Milano, Italia). Per facilitare la dispersione dell'olio nell'acqua, il brodo di coltura è stato diluito con Tween 20 nella percentuale del 10%. Ogni ceppo è stato testato con i campioni, diluiti in brodo in modo da ottenere concentrazioni comprese in un range tra 100 µg/ml e 0,8 µg/ml. I campioni previamente sterilizzati con un filtro Millipore di 0,45 µm., sono stati prelevati ed inoculati con 50 µg/ml di soluzione fisiologica contenente 5×10^6 cellule batteriche ed incubati per 24h alla temperatura di 37° C. I valori della MIC sono stati determinati come la più bassa concentrazione di olio che non permetteva alcuna visibile crescita di microrganismi, dopo incubazione. E' stato fatto un controllo con solo Tween 20, che non risultava tossico per i microrganismi. Come controllo positivo, è stata usata una coltura contenente solo soluzione fisiologica sterile tamponata. La MCB è stata determinata effettuando subcolture in 5 ml di brodo nutriente sterile con materiale prelevato dai tubi che mostravano inibizione della crescita batterica.

Dopo l'incubazione a 37° C, i tubi sono stati osservati per rilevare l'assenza di crescita batterica e quindi l'azione battericida dei campioni. I campioni di olio sono stati testati tre volte.

3.3 Risultati

3.3.1 Composizione degli oli essenziali

Il metil cavicolo (85.7%) è il principale componente dell'olio di *Ocimum basilicum*. La sua composizione chimica dimostra che la pianta esaminata appartiene al chemiotipo ricco in estragolo⁴¹.

L'olio di *Mentha piperita* è caratterizzato dall'alto contenuto di *trans*-mentone (36.6%), *trans*-mentolo (23.2%) e *trans* mentil acetato (13.3%).

Come già constatato in studi precedenti (Reverchon and Senatore, 1992), α -pinene (20.9%), 1,8-cineolo (18.8%) e borneolo (15.9%) costituivano i componenti principali dell'olio essenziale di *Rosmarinus officinalis*.

L'olio essenziale di *Salvia officinalis* è risultato molto ricco di α - e β - tuione (rispettivamente 15.7% e 16.5%) e presenta anche buone quantità di 1,8-cineolo (12.4%).

Infine il *Thymus pulegioides* è caratterizzato da un elevato contenuto di timolo (26.8%) e dei suoi precursori *p*-cymene (20.4%) e γ -terpinene (14.6%). Quindi la pianta esaminata appartiene al chemiotipo ricco in composti fenolici (Senatore, 2000).

I risultati dell'analisi sono mostrati in tabella 24.

3.3.2 Attività antibatterica

I dati relativi ai cinque oli essenziali hanno mostrato una maggiore attività sui batteri Gram positivi, come si evince dai bassi valori di MIC (tab. 25). Tra i batteri Gram +,

lo *Streptococcus faecalis* è il meno sensibile all'effetto degli oli. Tra i batteri Gram – la *Pseudomonas aeruginosa* è poco sensibile o non lo è affatto (MIC = 100 o > di 100 µg/ml per tutti gli oli testati). L'olio essenziale di timo è il più attivo ed i *B. subtilis*, *B. cereus* e l'*E. coli* sono i più sensibili (MIC = 3.12 µg/ml) all'effetto biocida di questi oli.

L'olio di salvia è inattivo (MIC >100 µg/ml) o è molto poco attivo (MIC = 100 µg/ml). Anche l'olio essenziale di basilico è inattivo o è poco attivo sui batteri testati eccetto che su *E. coli* (MIC = 25 µg/ml). L'olio di rosmarino mostra un'ottima attività (MIC = 12.5 µg/ml) contro il *B. subtilis*, il *B. cereus* e l'*E. coli* ed una buona attività sugli altri batteri. Anche l'olio di menta mostra un'ottima attività (MIC = 12.5 µg/ml) contro il *B. subtilis* mentre l'attività contro gli altri microrganismi è bassa.

L'attività antibatterica dell'olio essenziale di *Thymus pulegioides* è attribuibile alla presenza di composti fenolici ed alla presenza di monoterpeni come il *p*-cymene ed il γ -terpinene, dotati di una ben documentata attività antibatterica⁴². L'efficacia dell'olio di rosmarino può essere riferita al contenuto di composti come l' α -pinene, l'1,8-cineolo, la canfora^{43,44} e ad altri componenti presenti a basse concentrazioni, come il cariofillene e l' α -terpineolo^{45,46}. Ad ogni modo va considerata la possibilità di una sinergia d'azione tra le sostanze che potrebbe influenzare le proprietà antibatteriche degli oli.

La minore attività antibatterica dell'olio di menta verso molti ceppi batterici può trovare una spiegazione nel fatto che l'olio è completamente privo di fenoli e di altri

composti presenti invece negli oli di timo e di rosmarino, esso però è caratterizzato da un'alta concentrazione di mentone, un composto che possiede attività antibatterica^{47,48}.

Tabella 24. Composizione dell'olio essenziale delle cinque Lamiaceae

K _i ^a	Composto	Identificazione ^b	O.b. ^c	M.p. ^c	R.o. ^c	S.o. ^c	T.p. ^c
925	Triciclene	R _i , MS			T		T
928	α -Tuiene	R _i , MS	0.3				1.0
935	α -Pinene	R _i , MS, Co-GC		0.2	20.9	2.2	0.8
945	Camfene	R _i , MS, Co-GC	0.1		4.7	1.8	0.7
974	Sabinene	R _i , MS, Co-GC	T		0.8		0.3
978	β -Pinene	R _i , MS, Co-GC	0.4	0.4	0.9	0.4	
979	1-Octen-3-olo	R _i , MS			0.5		1.3
987	Mircene	R _i , MS, Co-GC	0.1	0.1	0.8	0.3	0.7
1016	α -Terpinene	R _i , MS, Co-GC					T
1022	<i>p</i> -Cimene	R _i , MS, Co-GC			1.3	0.7	20.4
1025	β -fellandrene	R _i , MS, Co-GC	1.2				0.1
1028	1,8-Cineolo	R _i , MS, Co-GC		3.5	18.8	12.4	0.4
1029	Limonene	R _i , MS, Co-GC	0.3		1.5		0.6
1037	<i>trans</i> -Sabinene idrato	R _i , MS					
1040	(Z)- β -Ocimene	R _i , MS	0.2	0.2			0.1
1044	(E)- β -Ocimene	R _i , MS	0.8	T			
1046	Δ^3 -Carene	R _i , MS			0.2		
1055	<i>cis</i> -Sabinene idrato	R _i , MS					
1061	γ -Terpinene	R _i , MS, Co-GC					14.6
1073	<i>p</i> -Cimenene	R _i , MS				0.1	0.1
1076	α -Tuione	R _i , MS				15.7	
1087	β -Tuione	R _i , MS				16.5	
1089	Terpinolene	R _i , MS	T				T
1092	Linalolo	R _i , MS, Co-GC	0.8		1.4		1.3
1124	Ment-2-en-1-olo	R _i , MS		0.1			
1125	<i>trans</i> -Mentone	R _i , MS		36.6			
1133	<i>cis</i> -Mentone	R _i , MS		4.1			
1135	Camfora	R _i , MS, Co-GC	T		9.7		0.2
1148	<i>trans</i> -Mentolo	R _i , MS		23.2			
1152	<i>cis</i> -Mentolo	R _i , MS		1.7			
1154	Pinocarvone	R _i , MS			0.5		
1162	Borneolo	R _i , MS, Co-GC	0.1		15.9	6.1	1.3
1163	Nonanolo	R _i , MS			0.4		
1168	Terpineol-4	R _i , MS			0.8	0.3	0.4
1177	Pulegone	R _i , MS		0.7			
1184	<i>p</i> -Cimen-8-olo	R _i , MS					
1188	α -Terpineolo	R _i , MS			2.2	0.3	0.4
1191	Methyl salicilate	R _i , MS, Co-GC					
1198	Estragolo	R _i , MS	85.7				
1212	Verbenone	R _i , MS			3.6		
1215	Carvone	R _i , MS				T	
1235	Timol metil etere	R _i , MS, Co-GC					4.3
1239	Carvacrol metil etere	R _i , MS					2.1
1242	Carvone	R _i , MS					
1248	Linalil acetato	R _i , MS, Co-GC		0.2	0.9		
1253	Piperitone	R _i , MS		1.3			

1275	Bornil acetato	R _i , MS		T			
1280	Bornil acetato	R _i , MS	0.1			0.5	
1282	Isobornil acetato	R _i , MS			1.7		
1282	<i>trans</i> -Mentil acetato	R _i , MS		13.3			
1288	<i>cis</i> -Mentil acetato	R _i , MS		0.6			
1290	Timolo	R _i , MS, Co-GC			1.0		26.8
1293	Carvacrolo	R _i , MS, Co-GC			0.2	0.1	3.9
1305	<i>p</i> -Metossiacetofenone	R _i , MS					
1340	Metil eugenolo	R _i , MS	0.2				
1343	α -Cubebene	R _i , MS		T	0.1		0.1
1349	Timil acetato	R _i , MS					1.4
1350	Eugenolo	R _i , MS, Co-GC					0.1
1356	Carvacril acetato	R _i , MS					0.2
1384	β -Bourbonene	R _i , MS		0.4			
1388	β -Elemene	R _i , MS	0.1	T			
1410	Aromadendrene	R _i , MS				0.2	
1413	Cariofillene	R _i , MS, Co-GC	0.6	3.5	1.3	4.0	5.8
1423	β -Gurjunene	R _i , MS		0.1	0.2		0.5
1427	γ -Elemene	R _i , MS		0.3		0.8	
1442	α - <i>trans</i> -Bergamotene	R _i , MS	1.0				
1445	<i>allo</i> -Aromadendrene	R _i , MS				0.2	0.1
1445	α -Humulene	R _i , MS	T	0.4		3.2	0.4
1465	γ -Gurjunene	R _i , MS			0.2		0.2
1466	β -Selinene	R _i , MS				0.1	
1468	γ -Muurolene	R _i , MS		0.2		0.1	
1477	Germacrene D	R _i , MS	1.3				
1494	γ -Cadinene	R _i , MS	T	3.7	0.1	4.9	
1511	β -Bisabolene	R _i , MS			0.1	0.4	0.8
1518	δ -Cadinene	R _i , MS		T	0.2		0.4
1522	α -Farnesene	R _i , MS			T		
1560	Ledolo	R _i , MS				0.6	
1572	Spatulenolo	R _i , MS	0.3	0.1		0.9	0.7
1575	Cariofillene ossido	R _i , MS, Co-GC		0.1	0.5		0.8
1584	Globulolo	R _i , MS					
1592	Esadecene-1	R _i , MS, Co-GC					0.1
1600	Esadecano	R _i , MS, Co-GC				1.1	0.2
1637	T-Muurololo	R _i , MS		0.1			
1640	T-Cadinolo	R _i , MS	0.1	0.5			
1698	α -Muurolene	R _i , MS			0.1		
1767	Manoolo	R _i , MS				4.5	
1771	Tetradecanoic acid	R _i , MS, Co-GC					T
1798	Sclareolo	R _i , MS				1.2	
1800	Octadecano	R _i , MS, Co-GC		T			
1972	Acido esadecanoico	R _i , MS, Co-GC					0.2
1981	Eicosene-1	R _i , MS, Co-GC					0.1
2300	Tricosano	R _i , MS, Co-GC			T		
2400	Tetracosano	R _i , MS, Co-GC			T		
2500	Pentacosano	R _i , MS, Co-GC			T		

^a: Indice di Ritenzione valuato su colonna DB-5

^b: R_i = Indice di ritenzione, MS = spettro di massa, Co-GC = co-injection con composti autentici.

^c: O.b. = *Ocimum basilicum* L.; M.p. = *Mentha piperita* L.; R.o. = *Rosmarinus officinalis* L.; S.o. = *Salvia officinalis* L.; T.p. = *Thymus pulegioides* L.

T = tracce, meno di 0.05%.

Tabella 25. attività antibatterica

Bacteria	<i>Ocimum basilicum</i>		<i>Mentha piperita</i>		<i>Rosmarinus officinalis</i>		<i>Salvia officinalis</i>		<i>Thymus. pulegioides</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	>100	>100	25	25	12.5	25	>100	>100	6.25	6.25
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	100	100	12.5	12.5	12.5	12.5	100	100	3.12	3.12
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	100	100	25	25	25	25	100	100	3.12	6.25
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 29212	>100	>100	50	100	50	50	>100	>100	25	25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25	50	50	50	12.5	12.5	100	100	3.12	3.12
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	100	100	50	100	50	50	100	100	25	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	> 100	> 100	>100	>100	100	100	>100	>100	100	100
<i>Salmonella typhi</i> Ty2 ATCC 19430	>100	>100	50	50	25	50	100	100	25	25

I valori di MIC e di MBC sono espressi come µg/mL⁴⁹

CONCLUSIONI

Il lavoro svolto per la realizzazione della tesi di dottorato è consistito nell'isolamento e nella valutazione dell'attività biologica di metaboliti da piante appartenenti alla famiglia delle Lamiaceae, in particolare del *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*, che è un genere poco studiato anche se possiede numerose proprietà farmacologiche conosciute da millenni e che è in commercio come rimedio erboristico per il trattamento di problemi delle vie respiratorie, per l'astenia ed i disturbi mestruali. Delle altre piante prese in esame sono state valutate la composizione e l'attività antibatterica dell'olio essenziale.

Lo studio fitochimico condotto sull'estratto acetico di *M. globosum* ssp. *libanoticum*, ha rivelato la presenza di cinque nuovi diterpeni naturali appartenenti alla classe dei labdani: il marrulibanoside, il deacetilvitexilattone, l'acido marrulanico, la miscela di composti 1 e 2 e di due composti già noti come: la cyllenina A e la 15-*epi*-cyllenina A.

E' stata anche testata l'attività antiinfiammatoria di tale estratto; l'azione antiflogistica sembra essere dovuta al diterpene isolato in maggior quantità: il marrulibanoside, che riduce i livelli delle PGE₂ e dei nitriti rispettivamente del 77% e del 82%.

Lo studio fitochimico dell'estratto metanolico di *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum* ha permesso di rilevare alcune importanti caratteristiche di questa specie: si è potuto constatare che, contrariamente a ciò che accade nelle altre specie, nel *M. globosum* ssp. *libanoticum* si trovano sei flavonoli quali: la quercetina 3-*O*- β -rutinoside, la quercetina 3-*O*- β -glucoside, il kampferolo 3-*O*- β -rutinoside, il kampferolo 3-*O*- β -

glucoside, l'isoramnetina 3-*O*- β -rutinoside, l'isoramnetina 3-*O*- β -glucoside, mentre i flavoni contenuti sono solo due: l'apigenina 7-*O*- β -glucoside e l'apigenina 7-*O*- β -(3''-*p*-cumaril)-glucoside

Come si può notare questi flavonoidi sono presenti esclusivamente in forma glicosilata, ciò rappresenta una altra peculiarità di questa specie poiché generalmente tali composti sono presenti sia come glicosidi che come agliconi liberi nel genere *Marrubium*. E' stata rilevata la presenza di un flavanone derivato, la naringerina 7-*O*- β -D-glucoside, la quale non è mai stata isolata precedentemente in questo genere.

Lo studio dell'olio essenziale delle parti aeree di *Marrubium globosum* Montbr. et Auch. ex Benth. ssp *libanoticum* (Boiss) Davis e di *M. cuneatum* Banks et Solander ha mostrato una differente composizione: i principali componenti di entrambi erano il β -cariofillene (12.4% - 5.2%), l'acido esadecanoico (7.4% - 6.5%) e lo spatulenolo (5.2% - 6.5%). Il biciclogermacrene (5.2%) è stato individuato solo nell'olio del *M. cuneatum*; quest'ultimo è anche caratterizzato da una grande quantità di germacrene D (15.6%). L'attività antibatterica del *M. globosum* era più elevata; quest'azione può essere spiegata dall'effetto sinergico di differenti componenti dell'olio come il linalolo, l' α -terpineolo e l'eugenolo con il carvacrolo; tale effetto può manifestarsi anche a piccole concentrazioni.

Tra le altre Lamiaceae studiate è stato interessante valutare le spiccate proprietà antibatteriche di alcune di esse quali il Timo ed il Rosmarino dovute alla presenza nell'olio di timolo, di carvacrolo e di composti che possono aumentarne l'attività per sinergia.

L'isolamento e l'identificazione dei componenti presenti in quantità minime, grazie alle più recenti tecniche di spettroscopia NMR e spettrometria di massa, può

essere di fondamentale importanza per comprendere le proprietà farmacologiche o la tossicità e l'interazione di un prodotto erboristico con altri prodotti o con i farmaci.

Infatti, a fianco ai benefici che possono derivare dalle piante medicinali esistono dei problemi legati all'interazione con i farmaci. L'Unione Europea ha commissionato delle ricerche tramite un programma definito BIOMED (Biomedical and Health Research) per definire gli standards europei per l'uso sicuro e corretto dei prodotti fitochimici per scopi medicinali. Per quanto riguarda l'utilizzo di erbe medicinali, estratti vegetali o derivati da purificazione parziale di estratti vegetali la situazione è resa complicata dal fatto che, a differenza dell'assunzione di prodotti farmaceutici, esiste raramente la possibilità da parte del consumatore di verificare lo stato di purezza, certificazione e standardizzazione del prodotto che sta acquistando.

Sebbene si consideri che l'uso di piante medicinali sia tradizionalmente innocuo, quando questi "rimedi" sono utilizzati per scopi terapeutici necessitano di un sistema di farmacovigilanza capace di identificarne i rischi potenziali. Di fondamentale importanza sono i centri regionali di farmacovigilanza presenti nei diversi paesi industrializzati che hanno il compito di annotare gli effetti avversi causati dall'assunzione di medicine basate su prodotti da erboristeria.

BIBLIOGRAFIA

1. Peterson, J.; Dwyer, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity
Nutritional Research 1998, vol **18**, N° 12, 1995-2018.
2. Hahlabrock K., Grisebach H., In "The Flavonoids", Harborne J. B. and Mabry, T.S.
Edit., London, 1975. 868.
3. Roginsky V.A., Bruchelt G., Stegmann H.B. Fully Reversible redox cyclic of 2,6-
dimethoxy-1,4-benzoquinone induced by ascorbate. (1998) Biochemistry (Mosc). **63**
200-206.
4. Kaul TN, Middleton E Jr, Ogra PL. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. J
Med Virol 1985;**15**: 71-79.
5. Gryglewski R. J., Korbut R., Robak J., Swies, J. (1987) Biochem Pharmacol., **36**,
317.
6. Palmer, R. M. J., Salmon J., In Drugs affecting leukotrienes and other Eicosanoid
Pathways, Plenum Press, New York. 1985. 311.
7. Mascolo N., Pinto A., Capasso F., (1988) J. Pharm. Pharmacol., **40** 293.
8. Chang W.S.; Lee Y.J. Lu F.J. Chiang H.C. (1993). Inhibitory effect of flavonoids on
xantine oxidase. Anticancer Res. **13** 2165-2170.
9. Murray, R.K., et al. (1994) New York, Appleton e Lange, Harper's Biochemistry, **23**,
196.
10. Greuter, W.; Burdet, H. M.; Long, G. Ed., Med-Checklist vol. **3** pag. 292-295. Ed.
Conservatoire et Jardins Botaniques, Ville de Genève 1986.
11. Sahpaz S., Garbacki N., Tits M., Bailleul F. (2002) *J. Ethnopharmacol.* **79** (3): 389-
392.
12. Novaes A. P., Rossi C., Poffo C., Pretti Junior E., Oliveira A. E., Schlemper V.,
Niero R., Cechinel-Filho V., Burger C. (2001) *Therapy* **56** (4): 427-430.
13. El Bardai S., Lyoussi B., Wibo M., Morel N. (2001) *Clin. Exp. Hypertens.* **23** (4):
329-343.
14. Savona G., Piozzi F. L. Aranguez B. Rodriguez *Phytochemistry* 1979; **18**: (5) 859-
860
15. Takeda Y, Yanagihara K, Masuda T, Otsuka H, Honda G, Takaishi Y *et al.* Labdane
diterpenoids from *Marrubium globosum* subsp. *globosum*. Chem.Pharm.Bull. 2000; 48:
1234-1235.

16. Karioti, A.; Heilmann, J.; Skaltza, H. *Phytochemistry* 2005, **66**, 1060-1066.
17. Boalino, D.M.; McLean, S.; Reynolds, W.F.; Tinto, W.F. *J. Nat. Prod.* 2004, **67**, 714-717.
18. Kondo, Y.; Sugiyama, K.; Nozoe, S. *Chem. Pharm. Bull.* 1986, **34**, 4829-4832.
19. Laonigro, G.; Lanzetta, R.; Parrilli, M.; Adinolfi, M.; Mangoni, L. *Gaz. Chim. Ital.* 1979, **109**, 145-150.
20. Di Rosa M., D.A. Willoughby, (1971) *J. Pharm. Pharmacol.*, **23**: 297.
21. T. Nunoshiba, T.De Rojas-Walker, S.R. Tannenbaum and B. Demple (1995) *Infect Immun.* **63** (3): 794-798.
22. Marotta P, Sautebin L, Di Rosa M. Modulation of the induction of nitric oxide synthase by eicosanoids in the murine macrophage cell line J774. *Br J Pharmacol.* 1992;**107**:640-1.
23. Rigano, D.; Grassia, A.; Borrelli, F.; Aviello, G.; Piozzi, F.; Bruno, M.; Apostolides Arnold, N.; Capasso, R. Senatore, F. *Planta Medica* **in press**.
24. Sahpaz S., Garbacki N., Tits M., Bailleul F. (2002) *J. Etnopharmacol* **79** (3) 389-392.
25. Calis, I., Hosny, M., Khalifa, T., Ruedi, P., (1992). *Phytochemistry* **31**, 3624
26. Nagy, M., Gergel, D., Grancai, D., Novomesky, P., Ubik, K. (1996). *Farmaceuticky Obzor* **12**, 283.
27. Karioti, A., Skaltsa, H., Heilmann, J., Sticher, O., (2003) *Phytochemistry* **64**, 655
28. Pedersen, G.A., (2000). *Biochem. Sys. Ecol.* **28**, 299.
29. Kowalewsky, Z., Matlawska, I., (1978) *Herba Polonica* **24** (4), 183.
30. El Shafae, Azza M., El Domiaty, Mather M. (1998) *Zagazig Journal of Pharmaceutical Sciences*, **7**(1), 48-53.
31. Tomàs-Barberà, F.A., Gil, M.I., Ferreres, F., Tomàs-Lorente, F., (1992). *Phytochemistry* **31**, 3097.
32. Rigano D., N. Apostolides Arnold, M. Bruno, C. Formisano, A. Grassia, S. Piacente, F Piozzi and F. Senatore *Biochem. Sys. Ecol.* **in press**
33. *European Pharmacopoeia*, Vol. III. Maisonneuve SA: Sainte- Ruffine 1997, p. 69.
34. Davies N. W. (1990) *J. Chromatogr.*, **503**, 1-24.
35. Jennings W. e Shibamoto T. (1980) *Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography*. Academy Press, New York.

36. Adams RP. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois, 1995.
37. *E.P.I.M.S.: Eight Peak Index of Mass Spectra*. 3rd edn., MSDC: Nottingham, 1983.
38. Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C. and Turck M., *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**, 493 (1966).
39. Bal Y., Kaban S., Kirimer N. and Baser K.H.C., *J. Essential Oil Res.*, **11**, 300 (1999).
40. Nik Z.B., Mirza M. and Shamir F., *Flavour Fragr. J.*, **19**, 233 (2004).
41. Lawrence B.M. A further examination of the variation of *Ocimum basilicum* L. In: Flavors and fragrances: A world perspective. Mookherjee B.D. and Willis B.J. Edits., Amsterdam, 1988.
42. Griffin S.G., Grant Wyllie S., Markham J.L. and Leach D.N. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity *Flavour Fragr. J.* **14**, 322 (1999).
43. Mazzanti G., Battinelli L. and Salvatore G. Antimicrobial properties of the linalool-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var. *decumbens* (Lamiaceae), *Flavour Frag. J.* **13**, 289 (1998).
44. Lis-Balchin M., Deans S.G., Eaglesham E. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour Frag. J.*, **13**, 98 (1998).
45. Kim J., Marshall R.M., and Wei C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2839 (1995).
46. Stassi V., Verykokidou E., Loukis A., Harvala C. and Philianos S. The antimicrobial activity of the essential oils of four *Juniperus* species growing wild in Greece. *Flavour Frag. J.* **11**, 71 (1996).
47. Marotti M., Piccaglia R., Giovanelli E., Deans S.G. and Eaglesham E. Effects of planting time and mineral fertilization on peppermint (*Mentha x piperita* L.) essential oil composition and its biological activity, *Flavour Frag. J.*, **9**, 125 (1994).
48. Sirvropoulou A., Kokkini S., Lanaras and Arsenakis T. Antimicrobial activity of mint essential oils, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2384 (1995).
49. F. Senatore, R. De Fusco, A. Grassia, C. O. Moro, D. Rigano and F. Napolitano *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 6 (3) 2003 166-173.

Testi di carattere generale consultati:

- Benigni R., Capra C. e Cattorini P. E., *Piante Medicinali*. Inverni Della Beffa; Milano.
- Cacchi S., Caglioti L., Rosini G. *Chimica delle sostanze naturali complementi di biochimica*. Ambrosiana, Milano.
- Capasso F., De Pasquale R., Grandolini G. e Mascolo N. *Farmacognosia* Springer 2000.
- Capasso F., G. Grandolini, *Fitofarmacia*, II edizione Springer, Milano 1999.
- Cappelletti C., *Trattato di Botanica*, UTET, Torino 1975.
- Dev S., Misra R., *CRC Handbook of Terpenoids*, CRC PRESS 1996.
- Dewick P. M., *Chimica, Biosintesi e Bioattività delle Sostanze Naturali*, Piccin, Padova 2001.
- Enciclopedia Motta, Milano 1962.
- Encyclopædia Universalis- Encyclopædia Universalis France, Éditeur à Paris 1968.
- Harborne J. B., *Comparative Biochemistry of Flavonoids*, Academic Press, London 1967.
- Harborne J. B., T. J. Mabry, H. Mabry, *The Flavonoids*, Chapman & Hall Edit., London 1975.
- Mabey R., *The complete New Herbal*, Gaia Books Limited, London 1988.
- Negri G., *Erbario figurato*, Ulrico Hoepli Milano.
- Pignatti S., *Flora d'Italia*, Edagricole, Bologna 1982.
- Samuelsson G., *Farmacognosia*, EMSI, Roma 1996.
- Schönfelder P. e I., *Atlante delle Piante Medicinali*, Franco Muzzio Editore, Padova 1989.
- Senatore F., *Biologia Farmaceutica*, Piccin, Padova 2004.
- Senatore F., *Oli Essenziali: Provenienza, estrazione ed analisi Chimica*, EMSI, Roma 2000.